

**Intrazelluläre strukturelle
Remodelingprozesse bei chronischem
Vorhofflimmern an humanen atrialen
Myokardproben**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Luisa Jungk
geboren am 17. Februar 1989 in Zwenkau

angefertigt an der: Klinik für Herzchirurgie
Herzzentrum Leipzig, Universität Leipzig
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Friedrich W. Mohr
Strümpellstraße 39, 04289 Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Dhein
Prof. Dr. med. Friedrich W. Mohr

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 20.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Formelzeichenverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Vorhofflimmern	1
1.2 Pathophysiologie des VHF	3
1.2.1 Initiierung von VHF	3
1.2.2 Remodelingprozesse und Stabilisierung des VHF	7
1.3 Aufbau der Kardiomyozyten	10
1.3.1 Allgemeines	10
1.3.2 Aufbau und Funktion der Mikrotubuli.....	11
1.3.3 Aufbau und Funktion des Golgi-Apparates.....	13
1.3.4 Vorkommen und Funktion der Cdk 5.....	14
2 Zielstellung der Arbeit.....	16
3 Material.....	18
3.1 Allgemeine Geräte.....	18
3.2 Allgemeine Materialien.....	19
3.3 Immunhistochemie.....	20
3.4 Antikörper	20
3.5 Puffer und Lösungen	21
3.6 Software.....	22
4 Methoden	23
4.1 Patientenpopulation	23
4.2 Gewinnung und Aufbereitung der humanen Vorhofproben	24
4.3 Immunhistochemie.....	26

4.3.1	Grundlagen der Immunhistochemie.....	26
4.3.2	Durchführung der Immunhistochemie.....	27
4.4	Mikroskopische Bildverarbeitung	29
4.4.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie.....	29
4.4.2	Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie.....	31
4.5	Bildauswertung.....	31
4.5.1	Auswertung Anti-GM 130 und α -Tubulin	31
4.5.2	Auswertung Anti-Stathmin und α -Tubulin.....	33
4.5.3	Auswertung Cdk 5 und phospho-GM 130	34
4.6	Konfokalmikroskopie.....	35
4.6.1	Grundlagen der Konfokalmikroskopie	35
4.6.2	Durchführung der Konfokalmikroskopie	35
4.7	Lineare Korrelationen	36
4.8	Statistik.....	36
5	Ergebnisse.....	37
5.1	Immunfluoreszenzfärbung von Anti-GM 130 und α-Tubulin	37
5.1.1	Fluoreszenzintensitätsmessung von Anti-GM 130 als Golgi-Apparat Marker	37
5.1.2	Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente	40
5.1.3	Größe der Golgi-Apparat Fragmente.....	42
5.1.4	Anzahl der Tubulinfilamente	44
5.2	Immunfluoreszenzfärbung Anti-Stathmin und α-Tubulin	46
5.3	Immunfluoreszenzfärbung Cdk 5 und phospho-GM 130.....	47
5.4	Konfokalmikroskopie.....	50
5.5	Lineare Korrelationen	51

5.5.1	Lineare Korrelationen zwischen den histologischen Ergebnissen und den Parametern Ejektionsfraktion sowie Diameter des linken Vorhofs.....	51
5.5.2	Lineare Korrelationen zwischen den histologischen Ergebnissen untereinander.....	69
6	Diskussion.....	71
6.1	Intrazelluläre Veränderungen bei VHF	71
6.2	Morphologie und Anordnung des GA bei VHF sowie Ursachen und Folgen seiner Fragmentierung.....	71
6.3	Ursachen und Folgen der Depolymerisation der MT bei VHF.....	78
6.4	Zusammenhang zwischen Stathmin, MT und GA bei VHF	87
6.5	Aktivierung der Cdk 5 bei VHF und der Zusammenhang mit den MT, GA sowie Stathmin	90
6.6	Gleiche Verteilung von Anti-GM 130 und phospho-GM 130 bei SR und VHF	94
6.7	Methoden und Limitationen.....	95
6.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	97
7	Zusammenfassung	100
8	Literaturverzeichnis.....	103
9	Abbildungsverzeichnis	121
10	Tabellenverzeichnis.....	123
11	Diagrammverzeichnis	124
12	Anlagen.....	127
13	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	138
14	Lebenslauf	139
15	Danksagung	141

Abkürzungs- und Formelzeichenverzeichnis

/min	pro Minute
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
10 x Objektiv	Objektiv mit 10-facher Vergrößerung
100 x Objektiv	Objektiv mit 100-facher Vergrößerung
20 x Objektiv	Objektiv mit 20-facher Vergrößerung
40 x Objektiv	Objektiv mit 40-facher Vergrößerung
5 x Objektiv	Objektiv mit 5-facher Vergrößerung
ACE	Angiotensinkonversionsenzym
ADH	antidiuretisches Hormon
AG	Arbeitsgemeinschaft
AK	Antikörper
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atrionatriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AT ₁ Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase Typ 2
Cdk 2	Zyklin abhängige Kinase 2

Cdk 5	Zyklin abhängige Kinase 5
CHA ₂ DS ₂ -VASc-Score	Score zur Risikoabschätzung eines Schlaganfalls bei VHF, Kriterien: Herzinsuffizienz, Bluthochdruck, Alter ≥ 75 Jahre (2 Punkte), Diabetes mellitus, Schlaganfall (2 Punkte), vaskuläre Erkrankung, Alter 65-74 Jahre, Geschlechts-Kategorie (weiblich)
COP	<i>cytosolic coat protein</i>
Cx43	Connexin 43
D	Auflösungsvermögen des Objektivs
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-2
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiografie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
g	Gramm
GA	Golgi-Apparat
ggf.	gegebenenfalls
gj	<i>gap junctions</i>
GM 130	Golgi Matrix Protein 130
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GRASP65	<i>Golgi reassembly stacking protein 65</i>
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, erste menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IAA	isolierte atriale Amyloidose
IgG	Immunglobulin G

IRAAF	intraoperativen Radiofrequenzablationen
iv.	intravenös
l	Liter
LA	linker Vorhof des Herzens
LV	linke Kammer des Herzens
M	Molar
MAP	Mikrotubuli assoziierte Proteine
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mb.	Morbus
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n. A.	numerische Apertur
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Ncl.	Nucleus
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
nm	Nanometer
NS	Nervensystem
o. ä.	oder ähnliches

o. g.	oben genannt
PKA	Proteinkinase A
p-Wert	Signifikanzwert
Q1	Quartil 1
Q3	Quartil 3
R ²	Bestimmtheitsmaß
RA	rechter Vorhof des Herzens
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RV	rechte Kammer des Herzens
RyR2	Ryanodin Rezeptor Typ 2
SAIC	<i>Stretch-activated ion channels</i>
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	sarkoplasmatische Retikulum Calcium-Adenosin Triphosphatase
SMA	spinale Muskelatrophie
SNARE Komplexe	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SOD 1	Superoxiddismutase 1
sog.	sogenannte
SpR	sarkoplasmatisches Retikulum
SR	Sinusrhythmus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TPPP	<i>tubulin polymerization-promoting protein</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Salzsäure
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
v. a.	vor allem

VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
VHF	Vorhofflimmern
λ	Wellenlänge in nm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist eine supraventrikuläre Tachykardie, die durch eine schnelle, unkoordinierte und ineffektive Vorhofkontraktion gekennzeichnet ist. Es ist die am häufigsten vorkommende tachykarde Herzrhythmusstörung. Derzeit sind 2,5 % der deutschen Bevölkerung betroffen, davon mehr Männer als Frauen (Schnabel, 2012). Mit fortschreitendem Alter nimmt auch das Risiko, an VHF zu erkranken, zu. Bei Männern im Alter von 35 bis 44 liegt die Prävalenz etwa bei 0,7 % und bei den 65- bis 74-Jährigen bereits bei ca. 10,6 % (Schnabel, 2012). Bekannte Risikofaktoren, an VHF zu erkranken, sind neben dem Alter u. a. auch das männliche Geschlecht, Hypertension, vorbestehende Herzklappenerkrankungen, links ventrikuläre Dysfunktionen, Kardiomyopathien, angeborene Herzerkrankungen sowie eine genetische Prädisposition (Andrade et al., 2014). Obwohl bei Männern die Prävalenz für VHF höher ist als bei Frauen, ist VHF bei dem weiblichen Geschlecht mit einer höheren Letalität verbunden (Emdin et al., 2016).

Die Erkrankung kann asymptomatisch verlaufen, aber auch mit Palpitationen, Herzrasen, Dyspnoe, Schwindel und Synkopen einhergehen. Die drei letztgenannten Symptome entstehen durch hämodynamische Beeinträchtigungen und ein vermindertes Herzzeitvolumen. Dadurch kann es auch zu thorakalen Missempfindungen kommen, die einem Myokardinfarkt ähneln (Fauci et al., 2008). Des Weiteren erhöht sich das Risiko, Gefäßverschlüsse durch Thromboembolien zu erleiden. Wegen der ineffektiven Vorhofkontraktion am Ende der Diastole kommt es zu einer verminderten Ventrikelfüllung, weshalb sich das Schlagvolumen reduziert und infolgedessen eine verschlechterte Hämodynamik resultiert. Das fördert die Thrombenbildung in den Vorhöfen, sodass das Risiko, z. B. einen Schlaganfall zu erleiden, gesteigert wird (Fauci et al., 2008).

Diagnostisch ist die Arrhythmie im EKG sichtbar. Treten die Symptome täglich auf, empfiehlt sich ein 24-Stunden-EKG. Elektrokardiografisch sind auf Grund der unkoordinierten Vorhoferregungen keine geordneten p-Wellen zu erkennen (s. Abbildung 1-1). Stattdessen finden sich unregelmäßige fibrillierende Wellen mit Frequenzen von bis zu 300/min. Diese Unregelmäßigkeiten führen zu einer

unkoordinierten Erregungsüberleitung auf die Kammern, sodass VHF zu einer absoluten Arrhythmie der Ventrikel führt. Die RR-Abstände sind somit gänzlich verschieden (Trappe und Schuster, 2011).

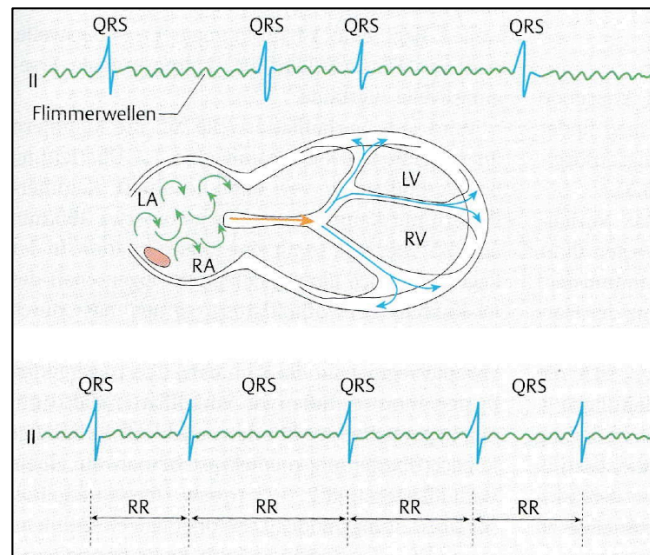


Abbildung 1-1 schematische Darstellung der Pathophysiologie bei VHF sowie der EKG-Veränderungen (Trappe und Schuster, 2011)

Die Darstellung zeigt eine unkoordinierte Erregungsbildung und -ausbreitung in den Vorhöfen mit einer daraus folgenden absoluten Arrhythmie der Kammern. Daraus resultieren im EKG mangelnde p-Wellen, fibrillierende Wellen sowie unterschiedliche RR-Intervalle.

VHF ist eine chronisch fortschreitende Erkrankung. Es gibt mehrere Arten von VHF, für die unterschiedliche Therapieansätze etabliert sind. Paroxysmales VHF dauert maximal 48 Stunden an und ist selbstterminierend mit einem spontanen Übergang in den Sinusrhythmus (SR). Von persistierendem VHF spricht man, wenn keine spontane Beendigung der Episoden innerhalb von sieben Tagen möglich ist, sondern sich das VHF nur durch medikamentöse oder elektrische Kardioversion terminieren lässt. Permanentes VHF ist weder medikamentös noch elektrisch in den SR konvertierbar (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie und European Society of Cardiology, 2012).

Therapeutisch stehen zum einen die Frequenzkontrolle und zum anderen die Rhythmuskontrolle im Vordergrund. Die Frequenzkontrolle, die v. a. bei permanentem bzw. chronischem VHF Anwendung findet, erfolgt medikamentös mit Betablockern, Calciumantagonisten, Digitalis oder Amiodaron. Sie kann aber auch durch Ablation des AV-Knotens erreicht werden, was heute jedoch nur noch selten durchgeführt wird (Trappe, 2012). Die Rhythmuskontrolle findet eher bei paroxysmalem und persistierendem VHF Anwendung. Sie kann ebenfalls

medikamentös mit Antiarrhythmika wie z. B. Amiodaron, Flecainid, Propafenon oder Vernakalent erfolgen. Des Weiteren ist zur Rhythmuskontrolle aber auch die elektrische Kardioversion möglich, die R-Zacken getriggert die Konversion zum SR anstrebt. Neben Medikamenten und elektrischer Kardioversion ist auch hier eine Ablation möglich. Diese erfolgt im Bereich der Pulmonalvenen, weil dort wahrscheinlich das VHF entsteht (s. Kapitel 1.2.1) (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie und European Society of Cardiology, 2012). Neben den oben genannten Therapien ist zusätzlich wegen der erhöhten Gefahr von Thromboembolien und Schlaganfällen eine Antikoagulation nötig. Die Einschätzung des Schlaganfallrisikos erfolgt mit Hilfe des CHA₂DS₂-VASc-Scores. VHF Patienten, die mindestens einen Risikofaktor aufweisen, sollen laut der aktuellen Leitlinie für VHF oral antikoaguliert werden. Das kann sowohl mit den neuen oralen Antikoagulantien, als auch mit Vitamin-K-Antagonisten erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie und European Society of Cardiology, 2012).

1.2 Pathophysiologie des VHF

1.2.1 Initiierung von VHF

VHF manifestiert sich oft im Rahmen von vorbestehenden kardiovaskulären Erkrankungen, z. B. Herzklappendefekte, Herzinsuffizienz, Hypertonie, Diabetes mellitus usw. (Lewalter, 2011). Bereits 1959 entstand durch Moe und Mitarbeiter das theoretische Konzept der multiplen Kreiserregungswellen im Vorhof. Allesie und Kollegen (1985) unterstützen diese Annahmen, indem sie diese am Vorhofpräparat nachwiesen. Die Mikro-Reentrykreisläufe führen zu einer schnellen, unkoordinierten elektrischen Aktivierung der Vorhöfe mit einer unregelmäßigen Überleitung auf den AV-Knoten und somit auf die Kammern. Dadurch entsteht eine absolute Arrhythmie. Wegen der fehlenden kontrollierten Vorhofkontraktion am Ende der Diastole füllen sich die Ventrikel nicht vollständig mit Blut und es kommt zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzens (Schrickel, 2012).

Die fokalen Triggerarrhythmien, die multiple Kreiserregungen entstehen lassen, werden laut Haïssaguerre und Mitarbeitern (1998) in den Pulmonalvenen initiiert. Die Arbeitsgruppe wies Herzmuskelzellen nach, die aus der Tiefe der

Pulmonalvenen ausgewandert sind und den Vorhof schnell erregen konnten. Im Bereich der Pulmonalvenen ist das Herz fixiert und aufgehängt, sodass es dort durch die ständigen Herzmuskelkontraktionen zu großen Zugkräften kommt. Es wird angenommen, dass die Zugkräfte die ektopen Zellen erregen und so VHF auslösen können (Dhein, 2011). Im Bereich der Pulmonalvenen scheinen die atrialen Myozyten, die die fokalen Erregungen initiieren, den normalen Myozyten hinsichtlich des kontraktile Aufbau zu gleichen. Obwohl die Rolle der *gap junctions* (gj, interzelluläre Kanäle zur Erregungsweiterleitung) in Bezug auf die Entstehung von VHF noch nicht gänzlich geklärt ist (Dhein, 2006), zeigen sich jedoch in den auslösenden Myozyten vergrößerte gj und eine hohe Konzentration an *Connexin 43* (Transmembranprotein, das die gj aufbaut). Die Myozyten liegen wie eine Manschette spiralförmig um die Pulmonalvenen herum. Diese Geometrie scheint für die Auslösung atrialer fokaler Tachyarrhythmien zu prädisponieren (Verheule et al., 2002). Diese Annahme begründet die Pulmonalvenenisolation als eine Therapieoption bei VHF. Sie erfolgt entweder durch Katheterablationen oder durch chirurgisch durchgeführte Ablationen.

Alle Patienten, deren VHF Gewebeproben in den Jahren 2000 bis 2001 gewonnen und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, erhielten eine chirurgische Ablation. Sie wurde als intraoperative Radiofrequenzablation (IRAAF) entweder als singulärer Eingriff oder im Zusammenhang mit Herzklappenoperationen durchgeführt. Der Ablationskatheter wurde in das *Atrium sinistrum* eingebracht, wo zwischen dem Mitralklappenannulus und dem Übergang zu den *Venae pulmonales* die unipolare Verödung mit Hochfrequenzstrom erfolgte (Mohr et al., 2002). Der Vorgang der Ablation führte zur Nekrosenbildung und somit zur elektrischen Isolation der tief sitzenden Zellnester am Übergang der Pulmonalvenen. Das sollte verhindern, dass sich ungewollte Erregungen bilden und ausbreiten (Schrickel, 2012). Die IRAAF wird jedoch wegen der erhöhten Gefahr von Ösophagusperforationen so heute nicht mehr durchgeführt (Doll et al., 2003). Studien zeigten, dass die Verwendung von bipolaren Radiofrequenzstrom bei der Pulmonalvenenisolation weniger Komplikationen mit sich bringt (Prasad et al., 2003; Melby et al., 2006). Neben der bipolaren Radiofrequenztherapie ist auch die Kryotherapie heutzutage eine geeignete Variante, um transmurale Verödungen und somit atriale Läsionen zu erreichen. Beide Therapieformen erzielen in 90% der Fälle eine Beendigung von VHF (Ramlawi et al., 2015).

Neben den Triggerarrhythmien nahe der Pulmonalvenen scheint auch das autonome Nervensystem (NS) in der Entstehung von VHF eine Rolle zu spielen. Das Herz ist sehr gut durch das vegetative NS innerviert. Die Ganglienzellen befinden sich entweder außerhalb oder innerhalb des Herzens (Chen et al., 2014). Zu dem extrinsischen NS gehören der *Nervus vagus* und der Sympathikus. Es ist bekannt, dass sympathische Komponenten im *Nervus vagus* vorkommen und so Tachykardien auslösen können (Chen et al., 2014). Zu dem intrinsischen NS zählen atriale Kardiomyozyten, die mehr sympathisch innervierte Nervenzellen aufweisen, als andere Herzmuskelzellen und dadurch potenzielle proarrhythmogene Schrittmacherfunktionen besitzen (Nguyen et al., 2009). Sympathische Hyperinnervationen in den Vorhöfen nach Herzerkrankungen, wie Myokardinfarkt, erhöhen ebenfalls das Risiko für VHF (Miyauchi et al., 2003). Außerdem kann das autonome NS die β -adrenergen Rezeptoren der Kardiomyozyten stimulieren, durch die dann eine massive Calciumfreisetzung induziert wird, das wiederum Arrhythmien fördert. Normalerweise verursacht die Depolarisation eines Aktionspotentials (AP) einen primären Calciumeinstrom in die Herzmuskelzelle. Dieser aktiviert über den Ryanodin Rezeptor Typ 2 (RyR2) eine sekundäre Calciumfreisetzung aus den Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums (SpR). Aus dieser sogenannten Calcium induzierten Calciumfreisetzung resultiert eine Kontraktion der zahlreichen Myofilamente und somit der Herzmuskelzellen. Nach der Kontraktion folgt die Wiederaufnahme des Calciums ins SpR über die sarkoplasmatische Retikulum Calcium-Adenosin Triphosphatase (SERCA). Die SERCA wird durch Phospholamban reguliert bzw. inhibiert (Alberts et al., 2007). Des Weiteren wird das intrazelluläre Calcium über den Natrium-Calcium-Austauscher aus der Zelle abtransportiert. Stresssituationen aktivieren das autonome NS und die β -adrenergen Rezeptoren. Es folgen eine massive Calciumfreisetzung sowie Myokardkontraktion. Die adrenerge Aktivierung steigert die Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase Typ 2 (CaMKII) sowie die Proteinkinase A (PKA), die erstens den Calciumkanal in der Plasmamembran aktivieren, zweitens den RyR2 mit folglich Calciumfreisetzung aus dem SpR stimulieren und drittens Phospholamban inhibieren. Letztgenanntes würde das Calcium zurück ins SpR pumpen (Neef et al., 2010; Chen et al., 2014). Diese adrenerg stimulierte Calciumfreisetzung ist unter akuten Stressbedingungen physiologisch, da sie die Herzfunktion steigert. Werden

allerdings die sympathischen Ganglienzellen der hyperinnervierten Kardiomyozyten, die sich nahe der Pulmonalvenen befinden und für Arrhythmien prädisponieren, aktiviert, begünstigt die massive Calciumfreisetzung Rhythmusstörungen und folglich VHF (Chen et al., 2014). Des Weiteren inhibiert das autonome NS u. a. die nach intrazellulär gerichteten Kaliumkanäle. Das führt zu einem gestörten Ruhemembranpotential der Arbeitsmyozyten. Dadurch können sich die Repolarisationen und Refraktärzeit der Herzmuskelzellen verkürzen, frühe Nachdepolarisationen entstehen und multiple Reentrykreisläufe auftreten (Fink et al., 2006; Chen et al., 2014).

Außerdem ist bekannt, dass mechanischer Stretch in Form von Gewebedehnungen VHF auslösen kann. Bei vorbestehenden Herzerkrankungen wie der Herzinsuffizienz wirkt ein vergrößertes Volumen und somit ein größerer Druck auf die atrialen Wände. Dadurch werden die Herzmuskelzellen gedehnt sowie dilatiert, was z. B. Ionenkanäle aktivieren und dadurch Arrhythmien triggern kann (Satoh und Zipes, 1996). Auch durch vorbestehende Herzerkrankungen ausgelöste atriale Remodelingprozesse begünstigen die Entstehung von VHF (Aouar et al., 2013). Weiterhin scheinen Kardiomyopathien oder die oben genannte Herzinsuffizienz erhöhte Angiotensin II (Ang II) Konzentrationen zu bedingen, die in Fibrosebildungen, Erregungsleitungsstörungen und schließlich im VHF münden können (Li et al., 2001). Neben diesen strukturellen Veränderungen fördert wahrscheinlich auch die isolierte atriale Amyloidose (IAA) Herzrhythmusstörungen. Die Ablagerung fibrillärer Proteine bei der IAA behindert die Erregungsweiterleitung im Herzen und steigert so das Risiko für die Entstehung von VHF (Röcken et al., 2002). Herzklappenerkrankungen und eine daraus folgende gesteigerte Synthese sowie Sekretion des atrionatriuretischen Peptids (ANP) erhöhen das Risiko abermals (Röcken et al., 2002).

VHF kann also durch eine Vielzahl von Faktoren initiiert werden. Neben der Triggerung von Reentrykreisläufen durch ektope Myozyten nahe der Pulmonalvenen scheinen auch veränderte gg, das autonome NS mit sympathisch hyperinnervierten Kardiomyozyten, mechanischer Stretch, strukturelle Myokardveränderungen durch vorbestehende Herzerkrankungen, IAA und eine erhöhte Bildung des ANP sowie Ang II die Entstehung von VHF zu fördern.

1.2.2 Remodelingprozesse und Stabilisierung des VHF

VHF führt wegen der veränderten Zug- und Dehnungskräfte innerhalb und zwischen der Kardiomyozyten zu Anpassungsvorgängen, die das VHF aufrechterhalten. Es setzen Umbauprozesse ein, die die Erkrankung stabilisieren und somit zur Chronifizierung beitragen. Diese Prozesse werden als Remodeling bezeichnet, da sie das Herzmuskelgewebe auf verschiedene Weise verändern.

Das Remodeling erfolgt z. B. auf elektrischer Ebene. Es ist bekannt, dass VHF zu einer Lateralisierung der gj führt. In gesunden Herzmuskelzellen befinden sie sich vorrangig an den Zellpolen. Eine Lateralisierung der gj verursacht eine vermehrt transversale, statt longitudinale Erregungsausbreitung zwischen den Kardiomyozyten, was proarrhythmogen wirkt (Polontchouk et al., 2001; Dhein et al., 2011). Des Weiteren kann es in Folge des elektrischen Remodelings bei VHF zu einer Verkürzung der APs im Atrium kommen (Wijffels et al., 1995), die die Aufrechterhaltung der Arrhythmie begünstigen. Bei VHF entstehen viele atriale APs, die eine Calcium Akkumulation bis hin zu einer chronischen Calcium Überladung in den Kardiomyozyten bewirken. Diese Calciumüberladung aktiviert den Calcineurin/nukleären Faktor der aktivierten T-Zellen (NFAT), der in den Nucleus (Ncl.) wandert (Nattel und Harada, 2014). Dort induziert er zum einen die Transkription hypertroph und profibrotisch wirkender Gene, die eine Fibroblasten Proliferation bewirken und somit zum strukturellen Remodeling bei VHF beitragen (Chen et al., 2014). Zum anderen unterdrückt NFAT die Transkription der Gene, die für die Kodierung der L-Typ Calciumkanäle zuständig sind. Diese Herabregulation reduziert den einwärts gerichteten Calciumstrom in die Herzmuskelzellen, was die AP-Dauer verkürzt und dadurch Mikro-Reentrykreisläufe bei VHF begünstigt (Nattel und Harada, 2014). Außerdem hat der abgeschwächte Calciumeinstrom Wirkung auf kontraktile Umbauprozesse. Die Kontraktionskraft der Myofilamente sinkt bei einem Calciummangel. VHF führt auf Dauer zu einer verminderten Aktivität der PKA und folglich zu einer Dephosphorylierung von Phospholamban mit eingeschränkter Aktivität der SERCA. Das bedingt einen verringerten Calciumrücktransport ins SpR. Somit wird mehr Calcium über den Calcium/Natrium Transporter aus der Zelle ausgeschleust und der Calciumspeicher des SpR erschöpft sich kontinuierlich. Eine durch die CaMKII bewirkte Hyperphosphorylierung des RyR2

führt zu dessen Leck. Durch dieses Leck geht vermehrt Calcium aus dem SpR verloren, was die Speicher zusätzlich aufbraucht (Greiser et al., 2009). Daraus folgt ein kontinuierlich fortschreitender Calciummangel mit eingeschränkter Kontraktionskraft der atrialen Myozyten. Neben der Herabregulation der L-Typ Calciumkanäle kommt es bei VHF auch zu einer Hochregulation der einwärts gerichteten Kaliumkanäle (*inward rectifier* Kaliumkanal I_{K1}). Diese Kanäle sind für das Ruhemembranpotential und die terminale Phase der Repolarisation zuständig. Die vermehrt auftretenden Kaliumkanäle verkürzen die AP-Dauer und hyperpolarisieren das Membranpotential. Beide Vorgänge bewirken einen erhöhten Natriumeinstrom in die Zellen und somit eine gesteigerte Erregbarkeit der Herzmuskelzellen. Es resultieren eine Förderung und Aufrechterhaltung der Reentrykreisläufe und des VHF (Pandit et al., 2005).

VHF induziert also neben den elektrischen auch die bereits genannten kontraktile Remodelingprozesse. VHF führt wegen des erhöhten Füllungsvolumens in den Vorhöfen zu einer mechanischen Dehnung der Kardiomyozyten und zu einer atrialen Dilatation. Daraus resultieren eine reduzierte Kontraktilität und Compliance der Herzmuskelzellen (Schotten et al., 2004; Greiser et al., 2009). Diese Vorgänge gehen mit einer langsameren Blutflussgeschwindigkeit und folglich mit einem erhöhten Thromboserisiko einher (Greiser et al., 2009). Des Weiteren aktiviert VHF die Calpain Protease und begünstigt Myolysen. Das verringert die Troponin T, I und C Konzentrationen (Ke et al., 2008). Daraus resultiert eine verminderte, aber kaum ins Gewicht fallende Kontraktionseinschränkung der Herzmuskelzellen (Schotten et al., 2011). Außerdem aktiviert die schnelle Stimulation der Kardiomyozyten durch VHF die Histon Deacetylase, die eine Deacetylierung und Depolymerisierung von α -Tubulin bewirkt. Daraus folgt eine Zerstörung des Mikrotubuli (MT) Netzwerkes mit anschließender kontraktile Dysfunktion und Aufrechterhaltung des VHF (Zhang et al., 2014).

Die Umbauprozesse finden auch auf struktureller Ebene statt. So induziert VHF eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, perinukleäre Glykogenablagerungen, Myolysen, Veränderungen der Mitochondrien und Zellproteine sowie eine Zerstörung des SpR. Außerdem zeigt sich eine Dedifferenzierung der Kardiomyozyten in ein fetales Entwicklungsstadium, da es zu einer Reexpression des fetalen α -smooth muscle Aktin sowie zu einem Verlust von Desmin kommt

(Allessie et al., 2002). Vor allem aber entstehen in den Vorhofgeweben interstitielle Fibrosierungen und Kollagenablagerungen, die für die Leitungsstörungen und Mikro-Reentrykreisläufe bei VHF verantwortlich gemacht werden (Kostin et al., 2002; Boldt et al., 2004). Auch wurden vermehrt Amyloidablagerungen beobachtet. Die Veränderungen der extrazellulären Matrix, insbesondere die Fibrosierungen, führen zu Verzögerungen in der Erregungsausbreitung und -weiterleitung, sodass VHF begünstigt sowie aufrechterhalten wird (Dhein, 2011). Laky und Mitarbeiter entdeckten 2011 zusätzlich noch ein vermehrtes Auftreten von Vakuolen in den Kardiomyozyten, Hypertrophien, Anschwellungen von Mitochondrien, interstitielle Ödeme und die Akkumulation von sekundären Lysosomen. Alle diese Veränderungen erfolgen jedoch nicht nur im Rahmen von Degenerationsprozessen (Apoptosen, Myolysen), sondern viel mehr als physiologische Anpassung an den chronischen Calcium Überschuss sowie an den metabolischen und mechanischen Stress, der bei VHF auf die Herzmuskelzellen wirkt (Allessie et al., 2002).

Bei VHF kommt es neben den oben genannten Remodelingprozessen auch zu endokrinen Veränderungen, v. a. im Bereich des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Das Angiotensinkonversionsenzym (ACE), welches Angiotensin I (Ang I) zu Angiotensin II (Ang II) spaltet und durch eine Vasokonstriktion sowie eine Aktivierung von Aldosteron zu einer Blutdruckerhöhung führt, wird bei VHF in den Vorhöfen vermehrt gebildet. Das führt zu einem Wachstum der atrialen Zellen sowie zu einer verstärkten Fibrosebildung durch eine Proliferation der Fibroblasten (Allessie et al., 2002; Novo et al., 2008). Des Weiteren steigt die Ang II Bildung, was eine erhöhte Kollagensynthese und eine verminderte Kollagenaseaktivität bewirkt. Außerdem wird der Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 (AT₁ Rezeptor) im linken Vorhof hochreguliert (Boldt et al., 2003). Diese Prozesse verursachen strukturelle Veränderungen in den Vorhöfen in Form von Fibrosebildungen und Hypertrophien, die das VHF begünstigen und aufrechterhalten. ACE-Hemmer und AT₁ Rezeptorblocker können somit gegen VHF eingesetzt werden, um die Remodelingprozesse zu minimieren (Novo et al., 2008).

Zusammenfassend führen die Umbauprozesse zu zellulären und interzellulären Veränderungen (s. Tabelle 1-1), die arrhythmogen wirken, indem sie die Erregungsausbreitung verzögern und umleiten (mehr transversal als longitudinal).

Somit wird die Entstehung von Mikro-Reentrykreisläufen gefördert und VHF begünstigt sowie aufrechterhalten (Dhein, 2011). Bisläng gibt es aber kaum Erkenntnisse zu intrazellulären strukturellen Veränderungen z. B. des Zytoskeletts, welches durch Dehnungsprozesse verändert werden kann (Salameh et al. 2010; Dhein et al., 2014).

Tabelle 1-1 Pathophysiologie des VHF. Erklärungen, Abkürzungen und Quellen sind im Text zu finden.

Ursachen/ Faktoren	Initiierung von VHF	Stabilisierung von VHF
elektrisch	AP-Dauer↓, Reentry– Kreisläufe, veränderte gj, veränderte Ionenkanäle	AP-Dauer↓, L-Typ Calciumkanäle↓, Kaliumkanäle↑, SERCA↓, Lateralisierung der gj
mechanisch/ kontraktil	Stretch	Stretch/atriale Dilatation, MT Zerstörung, Kontraktilität↓,
strukturell	Fibrose, ektope Zellen nahe der Pulmonalvenen, Amyloidablagerungen	Vergrößerung der Mitochondrien, Fibrose, Glykogen-ablagerungen↑, Amyloid-, Kollagenablagerungen↑, interstitielle Ödeme, sek. Lysosomen↑, sekundär: Veränderungen der Erregungsausbreitung, Myolysen
metabolisch/ endokrin/ neuronal	ANP↑, Ang II↑, verändertes autonomes NS, Calciumeinstrom↑	Ang II ↑, AT ₁ Rezeptoren↑, ACE↑
andere	Alter, genetische Disposition, vorbestehende Herzerkrankungen, IAA	Alter, genetische Disposition, vorbestehende Herzerkrankungen

1.3 Aufbau der Kardiomyozyten

1.3.1 Allgemeines

Kardiomyozyten sind zylindrische 10 bis 15 µm dicke und etwa 100 µm lange Zellen, die longitudinal über *Disci intercalares* miteinander verbunden sind (s. Abbildung 1-2). Es entsteht ein funktionelles Synzytium, sodass die elektrischen Erregungen über die einzelnen Herzmuskelzellen weitergeleitet werden können. Die *Disci intercalares* bestehen aus Desmosomen, die eine Trennung der Zellen während der Kontraktionen verhindern, aus einer Zona adherens, die ebenfalls der mechanischen Stabilisierung dient, sowie aus gj, die als Kommunikationskontakte für die elektrische Kopplung zwischen den Zellen

zuständig sind (Sarantitis et al., 2012; Poeggel, 2009).

Das Zytoskelett gibt der Zelle Struktur, Stabilität und Form. Weiterhin ist es an Prozessen wie Zellteilung, Zellwachstum, Zellpolarität, intrazellulärer Vesikeltransport, Anordnung der Zellorganellen, Verteilung der Membranrezeptoren und an der zellulären Kommunikation beteiligt. Das Zytoskelett besteht aus drei verschiedenen Fasertypen: den Mikrofilamenten in Form von Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten sowie den Mikrotubuli (MT). Die Aktinfilamente sind für die Zellform sowie Zellbewegung zuständig und die Intermediärfilamente dienen der mechanischen Festigkeit (Alberts et al., 2007).

Da die MT in vorliegender Arbeit untersucht wurden, werden sie im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

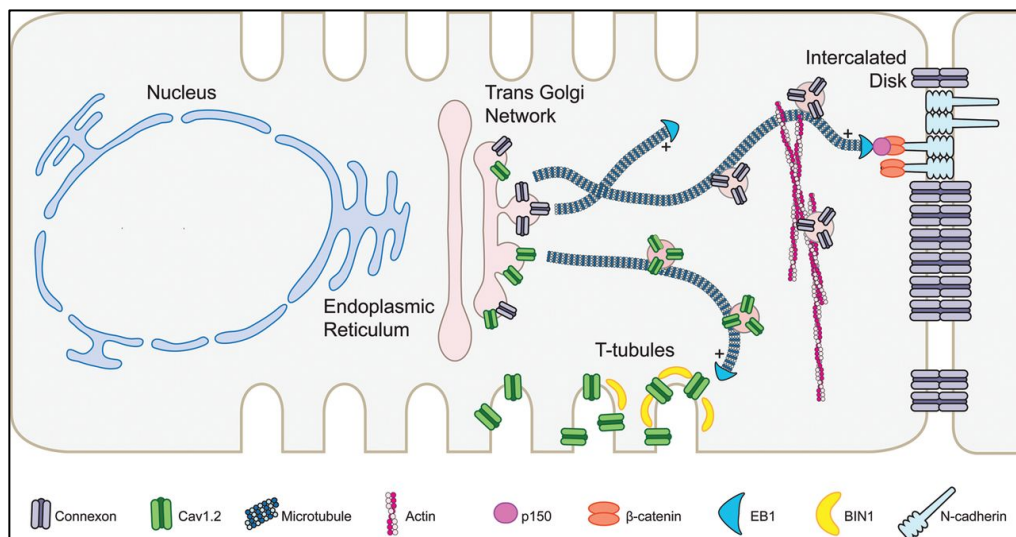


Abbildung 1-2 schematische Darstellung einer Kardiomyozyte mit dem Golgi-Apparat und der Mikrotubuli (Shaw und Colecraft, 2013)

1.3.2 Aufbau und Funktion der Mikrotubuli

Die MT dienen der Zellstabilität, dem intrazellulären Transport, der Stabilisierung von Zellorganellen (z. B. der Mitochondrien und des Golgi-Apparates) sowie der Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose (s. Abbildung 1-2). Außerdem sind die MT für die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten zuständig, indem sie die mechanischen Kräfte in intrazelluläre Signale umwandeln (Alberts et al., 2007; Sarantitis et al., 2012). Sie stabilisieren die kontrahierende Herzmuskelzelle und bieten eine gewisse Elastizität, indem die MT mit dem Desmin der Sarkomere interagieren (Robison et al., 2016). Die MT sind aus

Tubulin aufgebaut, welches als Heterodimer aus einer α - sowie einer β -Untereinheit besteht und in jeder eukaryotischen Zelle vorhanden ist. Mehrere Tubulineinheiten bilden ein Protofilament. 13 Protofilamente ergeben einen röhrenförmigen Mikrotubulus mit einem Durchmesser von etwa 20 nm und einer Länge von mehreren Mikrometern (Poeggel, 2009). Die MT entstehen nahe des Ncl. im Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC), auch Zentrosomen genannt, oder im Golgi-Apparat (GA) und wachsen in Richtung Peripherie (Zhu und Kaverina, 2013). Die reguläre und parallele Anordnung der Untereinheiten sorgt für eine strukturelle Polarität, sodass die Zelle zwischen apikal, basal, medial und lateral unterscheiden kann. Die MT haben ein Minus-Ende, gebildet durch eine α -Untereinheit, und ein Plus-Ende, abgeschlossen durch eine β -Untereinheit. Das Minus-Ende liegt nahe des Ncl. und das Plus-Ende in der Peripherie (Alberts et al., 2007). Die MT sind sehr dynamische Elemente und unterliegen ständigen Auf- und Abbauprozessen, indem das Tubulin entweder polymerisiert oder depolymerisiert. Dadurch sorgen sie für Flexibilität und eine Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzelle. Außerdem gibt es Motorproteine, die entlang der MT Vesikel, Membranproteine und Zellorganellen transportieren können. Das Motorprotein Kinesin transportiert die Proteine vom Minus- zum Pluspol in Richtung der Zellperipherie und das Motorprotein Dynein vom Plus- zum Minuspol in Richtung des Ncl. (Sarantis et al., 2012; Alberts et al., 2007). Die Motorproteine regulieren u. a. die Transporte des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des GA. Beispielsweise sorgt Dynein dafür, die Golgi Vesikel entlang der MT in Richtung Minusende also zum Zentrosom zu befördern (Alberts et al., 2007; Levy und Holzbaur, 2008). Zu den von den MT transportierten Proteinen gehören z. B. auch das Connexin 43 und andere Membranproteine (Dhein et al., 2014).

Verschiedene Proteine binden sich an die α - und β -Untereinheiten der MT und stabilisieren bzw. destabilisieren sie. Stathmin, das in vorliegender Arbeit ebenso betrachtet wurde, ist ein Regulatorprotein der MT. Es verhindert das Wachstum der MT an ihren Enden. Ein Stathminmolekül bindet sich an zwei Tubulin Heterodimere und vermeidet so die Anlagerung weiterer Tubulinmoleküle an die MT. Die Phosphorylierung von Stathmin inhibiert die Bindung an das Tubulin, sodass ein MT Wachstum stattfinden kann. Karzinomzellen überexprimieren in den meisten Fällen Stathmin, das auch Oncoprotein 18 genannt wird. Das führt zu einer vermehrten MT Umsatzrate mit Änderungen in der Zellform und potenzieller

maligner Entartung (Alberts et al., 2007). Deshalb gilt Stathmin als ein möglicher Prognoseparameter und neues Zielprotein für antitumoröse Therapien (Belletti und Baldassarre, 2011). Andere MT assoziierte Proteine (MAPs) stabilisieren die MT und ermöglichen Interaktionen der MT mit anderen Zellorganellen. Sie sind im Aufbau des Spindelapparates zu Beginn der Mitose involviert. Tau ist ein MAP, das ebenfalls am MT Aufbau beteiligt ist und intrazelluläre Zelltransporte gewährleistet. Während der Mitose werden die MAPs jedoch phosphoryliert, sodass sie inaktiviert werden und der nötige MT Abbau für die bevorstehende Zellteilung stattfinden kann (Alberts et al., 2007).

1.3.3 Aufbau und Funktion des Golgi-Apparates

Der GA, der in vorliegender Arbeit mit Hilfe des cis-Matrixproteins GM 130 untersucht wurde, ist eine aus mehreren abgeflachten und gestapelten Zisternen aufgebaute Zellorganelle. Er spielt eine wesentliche Rolle in vesikulären Transportprozessen. Der GA empfängt an seiner cis-Seite alle neu synthetisierten sekretorischen und transmembranösen Proteine vom ER. Er verarbeitet, sortiert und sendet sie über die trans-Seite zu ihrem entsprechenden Endziel, z. B. zu Endosomen, Lysosomen oder zur Zellmembran. Die Formation der Proteine zu Transportvesikeln und der Transport dieser erfolgt über *cytosolic coat proteins* (COP). Die COPs spalten sich bei Bedarf von der Golgi Membran ab und bewegen sich Richtung Ziel. Zusammen mit der Zielmembran bilden die COPs sogenannte *SNARE* Komplexe, sodass der Inhalt der COPs mit der Empfängermembran verschmelzen kann (Nakamura, 2010).

Während der Prophase der Mitose baut sich der GA ab, um sich nach der Zellteilung in der Interphase wieder aufbauen zu können. GM 130 ist ein Protein, das den GA mit anderen Proteinen zusammen (p115, Giantin, GRASP65, Rab) stabilisiert. Wird das GM 130 durch die Zyklin abhängige Kinase 5 (Cdk 5) und 2 (Cdk 2) phosphoryliert und dadurch inaktiviert, kommt es zur GA Fragmentierung (Nakamura, 2010). Aus diesem Grund wurde das phospho-GM 130 im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen ebenfalls analysiert. Der Prozess der GA Fragmentierung geschieht also physiologisch während der Mitose und auch Apoptose. Bei der Apoptose spalten Caspasen die Bindungsproteine GM 130, p115, Giantin, GRASP65 und Golgin-160 vom GA ab, sodass die Fragmentierung stattfinden kann. Es kann aber auch eine pathologische GA Fragmentierung

stattfinden, wie es bereits bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben (Bexiga und Simpson, 2013) und auch in vorliegenden Untersuchungen erstmals bei VHF entdeckt wurde.

1.3.4 Vorkommen und Funktion der Cdk 5

Die bereits genannte Zyklin abhängige Kinase 5 (Cdk 5), die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde, ist eine Serin-/Threonin Proteinkinase (Dhavan und Tsai, 2001). Sie reguliert im Gegensatz zu den anderen Kinasen der Familie nicht den Zellzyklus und wird auch nicht von Zyklinen aktiviert (Feldmann et al., 2010). Die Cdk 5 wird in allen eukaryontischen Geweben exprimiert und kommt im Nervensystem am häufigsten vor. Hauptsächlich spielt sie bei der postmitotischen Differenzierung von Neuronen und Gliazellen eine Rolle (Arif, 2012). Sie beeinflusst neben der neuronalen Axonentstehung, Membrantransporten, synaptischen Funktionen auch das Zytoskelett (Dhavan und Tsai, 2001). Die Cdk 5 ist mit den zytoskeletalen MT assoziiert, indem sie einige MAPs, wie z. B. Tau phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Tau reduziert dessen Bindungsaffinität zu den MT und sorgt so für den Abbau der MT (s. Abbildung 1-3). Abnormale Tau Phosphorylierungen durch eine hyperaktive Cdk 5 stehen im pathologischen Zusammenhang mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. Morbus (Mb.) Alzheimer, Mb. Parkinson und dem Down-Syndrom (Dhavan und Tsai, 2001). Des Weiteren scheint die Cdk 5 mit der Entstehung von Karzinomen assoziiert zu sein (Feldmann et al., 2010). Die Kinase wird durch ihre Bindungspartner p35 bzw. p39 phosphoryliert und aktiviert sowie in der Zellmembran verankert (Shukla et al., 2012). Bei Zellstress spaltet das Enzym Calpain proteolytisch den Cdk 5/p35 Komplex zu einem Cdk 5/p25 Komplex (Arif, 2012), der ins Zytosol wandert und dort neurotoxische Kaskaden triggern kann (s. Abbildung 1-3) (Sun et al., 2008). Außerdem ist bekannt, dass die Cdk 5 das GA stabilisierende Protein GM 130 phosphorylieren und so eine GA Fragmentierung induzieren kann (Sun et al., 2008). Deshalb wurde die Betrachtung dieser Kinase im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen als sinnvoll erachtet.

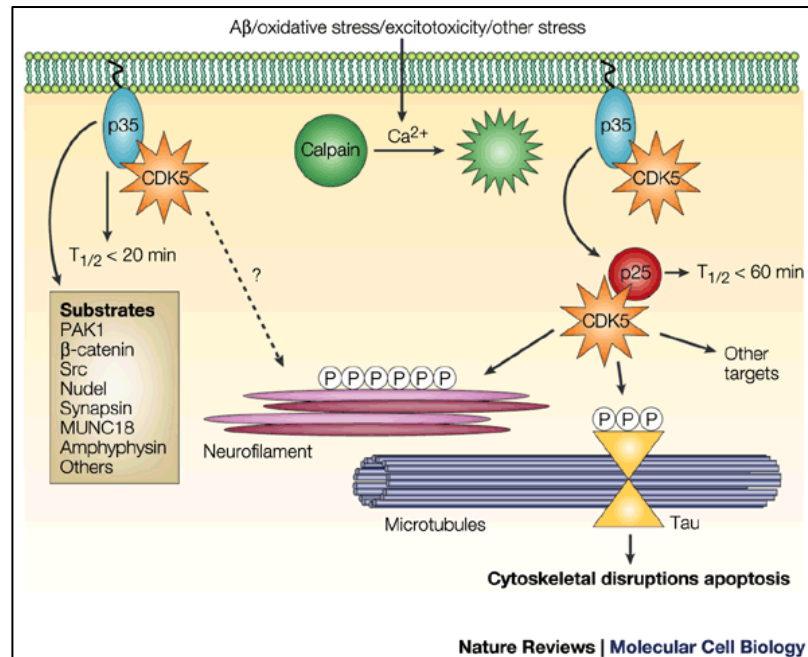


Abbildung 1-3 schematische Darstellung der Cdk 5 (Dhavan und Tsai, 2001)

Normalerweise ist die Cdk 5 mit p35 in der Zellmembran verankert und aktiviert. Unter Zellstress kommt es zu einem Calciueinstrom in die Zelle, der Calpain aktiviert. Calpain spaltet p35 zu p25, sodass der neu entstandene Cdk 5/p25 Komplex ins Zellinnere wandert und z. B. Tau phosphoryliert, das zu einem MT Abbau führt.

2 Zielstellung der Arbeit

VHF als die häufigste tachykarde Herzrhythmusstörung ist sowohl eine Ursache für, als auch Folge von multiplen Gewebeveränderungen. Diese Veränderungen dienen der Anpassung des Herzens an die veränderten Zug- und Dehnungskräfte. Sie verursachen aber auch die Aufrechterhaltung der Herzrhythmusstörung. Sie werden als Remodelingprozesse bezeichnet. Diese Vorgänge können in den Kardiomyozyten Veränderungen auf elektrischer, mechanischer, metabolischer und struktureller Ebene induzieren. Die strukturellen Remodelingprozesse geschehen sowohl intra- als auch interzellulär. Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse von intrazellulären Veränderungen des Zytoskeletts und des GA in den atrialen Kardiomyozyten bei VHF. Dies erscheint deswegen interessant, weil hieraus neue Erklärungsansätze für die bekannten Veränderungen auf der Ebene zellulärer Proteine geliefert werden könnten.

Der GA dient der Modifikation und dem Transport von Proteinen. Er wird bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen zerstört, das die Krankheiten stabilisiert und aufrechterhält. In vorliegender Arbeit gilt es herauszufinden, ob es auch bei VHF zu einer Zerstörung des GA kommt bzw. wie sich der GA zwischen der SR und VHF Gruppe bezüglich Lage und Morphologie unterscheidet. Des Weiteren werden die MT als zytoskeletale Bestandteile auf Veränderungen bei VHF untersucht. Zerstörte MT wirken sich auf die Zellstabilität, den Zelltransport, das Überleben der Zellen und somit auf die komplette Biophysikologie der Kardiomyozyten aus. Außerdem ist ein Ziel, die phospho-Stathmin Vorkommen zwischen beiden Gruppen zu vergleichen. Dieses Regulatorprotein hemmt den Abbau der MT und ist ggf. bei SR aktiver bzw. in größeren Mengen vorhanden. Ein weiterer intrazellulärer Bestandteil, den es in vorliegender Arbeit zu analysieren gilt, ist die Cdk 5. Sie beeinflusst die MT und kann eine GA Fragmentierung sowie toxische Kaskaden triggern. Somit soll die Frage geklärt werden, ob bzw. in welcher Form es bei VHF zu veränderten Aktivitäten der Cdk 5 kommt. Als letztes Protein wird in dieser Arbeit das phosphorylierte GM 130 betrachtet, das physiologisch den GA während der Mitose destabilisiert. Es wird untersucht, ob es bei VHF zu einer veränderten Lage sowie Häufigkeit des Proteins und somit zu einem erhöhten Stimulus zur GA Fragmentierung im Vergleich zu SR kommt. Eventuell stellen sich neue Perspektiven für kausale

Therapieansätze bei VHF dar. Es könnten sich in Zukunft Möglichkeiten bieten, die intrazellulären Veränderungen pharmakologisch zu beeinflussen und somit die strukturellen Prozesse bei VHF zu limitieren. Das könnte die Folgen von VHF evtl. minimieren. Jedoch erfordert diese Vermutung noch weiterführende Untersuchungen.

3 Material

3.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma	Ort
Einbettautomat	Tissue Tek VIP	Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen, Deutschland
Eismaschine	ZBE 30-10	ZIEGRA Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
Feinwaage	CP 225D	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzlampe	Ebq 100	Leistungselektronik Jena	Jena, Deutschland
Gefrierschrank	Gefrierschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Kamera Mikroskop	AxioCam MRc5	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena, Deutschland
Konfokalmikroskop	LSM 510	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena, Deutschland
Kühlplatte	COP 30	Medite GmbH	Burgdorf, Deutschland
Kühlschrank	Kühlschrank +4 °C	Robert Bosch GmbH	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axioplan 2, HBO 100	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena, Deutschland
Mikrotom	Microm HM 400 R	Microm GmbH	Walldorf, Deutschland
Mikrowelle	Micro-Chef MO 505, Moulinex	Krups GmbH	Offenbach/Main, Deutschland
pH-Meter	ph Level 1 InoLab	Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH	Weilheim, Deutschland
Paraffinwanne	Medax Typ 72040	Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
Tiefkühlschrank	Profi Frost	National Lab GmbH	Mölln, Deutschland
Vortex Mixer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries INC.	Bohemia, USA
Wärmeschrank	Wärmeschrank M 400	Memmert GmbH & Co. AG	Schwabach, Deutschland
Wärmewasserbad	Medax 24900	Nagel GmbH und Co	Neumünster, Deutschland

3.2 Allgemeine Materialien

Material	Bezeichnung	Firma	Ort
Deckgläschen	Deckgläser 18 x 18 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Destilliertes Wasser	Aqua dest. Milli Q Academic System	Millipore GmbH	Schwalbach, Deutschland
Einbettkassetten	Rotilabo Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf Tubes 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Treff AG	Degersheim, Schweiz
Immersionsöl	Immersol™ 518 F	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena, Deutschland
Messzylinder	500 ml, 1000 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen	Microtome blades S 22, stainless steel	Feather Safety Razor Co	Osaka, Japan
Objektträger	Thermo Scientific Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research® 2, 10, 100, 1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling, Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Spitzen für 10, 100, 1000 µl	Greiner-Bio-One GmbH	Frickenhäusen, Deutschland
Timer	KT 188	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe, Deutschland
Untersuchungs- handschuhe	Nitril NextGen®	Rösner-Mautby Meditrade GmbH	Kiefersfelden, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	TPP ® Zentrifugen- röhrchen 15	Faust Laborbedarf AG	Schaffhausen, Schweiz

3.3 Immunhistochemie

Chemikalie/ Material	Bezeichnung	Firma	Ort
Antikörper Diluent	Antibody Diluent with Background reducing components	DAKO	Glostrup, Dänemark
BSA	Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
DAPI	4',6-Diamidino-2' – phenylindol-dihydrochloride	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Eindeckmedium	Fluorescent Mounting Medium	DAKO	Glostrup, Dänemark
Ethanol	Ethanol vergällt ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Fettstift	DAKO-Pen	DAKO	Glostrup, Dänemark
HCl	Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Natriumhydroxid ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Xylol	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland

3.4 Antikörper

Primär-AK	Wirt	Hersteller	Bestellnummer	Lagerung
Anti-GM 130	Rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich®	G 7295	-20 °C
Anti-Stathmin 1 (phospho S37)	Rabbit polyclonal	Abcam®	ab 47399	-20 °C
Cdk 5	Goat polyclonal	Santa Cruz®	sc-32497	+4 °C
phospho-GM 130	Rabbit polyclonal	Santa Cruz®	sc-6306	+4 °C
α-Tubulin	Rat monoclonal	Santa Cruz®	sc-69970	+4 °C

Sekundär-AK	Wirt	Hersteller	Bestellnummer	Lagerung
Donkey-anti-goat IgG, Alexa Fluor® 555	Donkey	Invitrogen™	A21432	-20 °C
Donkey-anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 488	Donkey	Invitrogen™	A21206	+4 °C
Donkey-anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 555	Donkey	Invitrogen™	A31572	-20 °C
Goat-anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 555	Goat	Invitrogen™	A21428	-20 °C
Goat-anti-rat IgG, Alexa Fluor® 488	Goat	Invitrogen™	A11006	+4 °C

3.5 Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung	Lagerung
0,01 M Na-Citrat, pH 6	2,941 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1 l Aqua dest.	Raumtemperatur
1 x TBS, pH 7,6	100 ml 10 x TBS 900 ml Aqua dest.	Raumtemperatur
10 x TBS, pH 7,6	0,5 M Tris-HCl 1,5 M NaCl ad 1 l Aqua dest.	Raumtemperatur
2 % BSA/TBS-Lösung	2 g BSA in 100 ml 1 x TBS	-20 °C
4%iges Formalin nach Lillie, pH 7,0	22,5 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O 50,5 g NaHPO ₄ x 2H ₂ O 55 ml auf 37 % Formaldehyd ad 5 l Aqua dest.	Raumtemperatur
DAPI in TBS	1 : 500 in TBS, pH 7,6	-20 °C

3.6 Software

Verwendung	Bezeichnung	Firma	Ort
Bildauswertung	Zen lite 2011	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Daten- und Diagrammdarstellung	Microsoft Office Excel 2011	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Digitale Bildverarbeitung, Bildauswertung	AxioVision 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Erstellen von Abbildungen	Microsoft Office Power Point 2011	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Statistische Auswertung	Sigma Plot 10.0	Systat Software GmbH	Erkrath, Deutschland
Statistische Auswertung	SPSS Software	IBM Deutschland GmbH	Ehningen, Deutschland
Textverarbeitung	Microsoft Office Word 2011	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Z-stack Darstellung	Zeiss LSM Image Browser	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Jena, Deutschland
Z-stack Verarbeitung	Zen lite 2009, Zen 2 black edition	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland

4 Methoden

4.1 Patientenpopulation

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen Vorhofproben kamen bereits bei vorherigen Studien zum Einsatz. Zum einen stammten die Proben von der Studie „Reverses Remodeling des Vorhofgewebes nach Konversion von chronischem oder paroxysmalem Vorhofflimmern“ mit der Antragsnummer 012-10-18012009 und zum anderen von der Studie „Funktion, Expression und Regulation kardialer Ionenkanäle und Rezeptoren im Verlauf chronischer Herzerkrankungen und in Abhängigkeit vom Lebensalter“ mit der Antragsnummer 24-2002. Die Ethikkommission der Universität Leipzig genehmigte beide Studien.

Die Aufklärung der Patienten erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki und wurde mittels Unterschrift dokumentiert. Die detaillierten Patientencharakteristika sind in Tabelle 4-1 zu finden.

Insgesamt schloss die Studie 153 Patienten ein. Davon wiesen 129 Patienten die Diagnose „paroxysmales bzw. chronisches Vorhofflimmern“ auf. 24 Patienten mit Sinusrhythmus galten als Kontrollgruppe. Die SR Proben stammten größtenteils aus dem linken Vorhof (LA). Dennoch wurden einige wenige Proben sowohl aus dem rechten (RA), als auch aus dem LA gewonnen (zutreffend für sechs Gewebeschnitte). Die SR Myokardproben wurden im Zusammenhang mit Klappen- oder aortokoronaren Bypass Operationen entnommen. Die VHF Gewebeproben stammten alle aus dem LA. Sie wurden entweder im Rahmen von singulär erfolgten intraoperativen Radiofrequenzablationen (IRAAF) oder im Zusammenhang von Ablationen mit Klappenoperationen gesammelt. Alle Operationen erfolgten bereits in den Jahren 2000 bis 2001. Die IRAAF wird wegen des Risikos der Ösophagusperforation so heute nicht mehr durchgeführt (Doll et al., 2003) (siehe Kapitel 1.2.1).

Tabelle 4-1 Patientencharakteristika, Signifikanz fett gedruckt für $p \leq 0,05$

Parameter	Sinusrhythmus	Vorhofflimmern	p-Wert
Anzahl n	24	129	
Alter (Jahre) MW \pm SEM	64,7 \pm 2,0	59,9 \pm 1,0	0,08
Geschlecht (männlich)	14 (73,7 %)	82 (63,1 %)	0,37
Ejektionsfraktion (%) MW \pm SEM	64,7 \pm 1,8	56,8 \pm 1,2	0,01
Diameter linker Vorhof (mm) MW \pm SEM	42,8 \pm 1,8	47,7 \pm 0,8	0,03
<i>Nebenerkrankungen:</i>			
Mitralklappeninsuffizienz	5 (26,3 %)	78 (60,5 %)	0,005
Mitralklappenstenose	1 (5,3 %)	13 (10,1 %)	0,5
Aortenklappenerkrankung	13 (68,4 %)	21 (16,5 %)	<0,001
Hypertonie	12 (63,2 %)	75 (58,1 %)	0,68
koronare Herzerkrankung	2 (10,5 %)	26 (20,2 %)	0,32
Diabetes mellitus	2 (10,5 %)	22 (17,1 %)	0,47
<i>Operation:</i>			
Mitralklappenersatz	3 (15,8 %)	13 (10,1 %)	0,45
Mitralklappenrekonstruktion	1 (5,3 %)	56 (43,4 %)	0,001
Ablation	0	126 (98,4 %)	<0,001
<i>Präoperative Medikamente:</i>			
Beta-Blocker	13 (68,4 %)	93 (73,8 %)	0,62
ACE-Hemmer/ AT ₁ -Blocker	9 (47,4 %)	68 (54,4 %)	0,57
Digitalis	1 (5,3 %)	38 (30,4 %)	0,02
Antiarrhythmika	1 (5,3 %)	43 (34,4 %)	0,01
Calciumantagonisten	2 (10,5 %)	32 (25,6 %)	0,15

4.2 Gewinnung und Aufbereitung der humanen Vorhofproben

Die Gewebegewinnung geschah im Rahmen routinemäßig durchgeführter herzchirurgischer Eingriffe. Diese Operationen fanden unter Nutzung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) statt. Die HLM übernimmt während der Operation die Pumpfunktion des Herzens sowie die Lungenfunktion. Dieses medizintechnische Gerät ermöglicht Eingriffe am offenen, blutleeren Herzen bzw. an den herznahen, großen Gefäßen.

Durch Kanülierung der Vena cava inferior und superior fließt das venöse Blut zu der HLM (s. Abbildung 4-1). Sie eliminiert zunächst das Kohlenstoffdioxid aus dem venösen Blut und reichert es mit Hilfe des Oxygenators mit Sauerstoff an. Danach fließt das Blut zu einem Wärmeaustauscher, der das Blut abkühlen oder auch erwärmen kann. Das arterialisierte Blut wird anschließend über eine

Rollerpumpe sowie einer Kanüle in der Aorta ascendens dem Körper wieder zugeführt. Abbildung 4-1 stellt schematisch den Weg des Blutes über die HLM dar. Alternativ kann der Anschluss der HLM auch über die Femoralgefäße erfolgen.

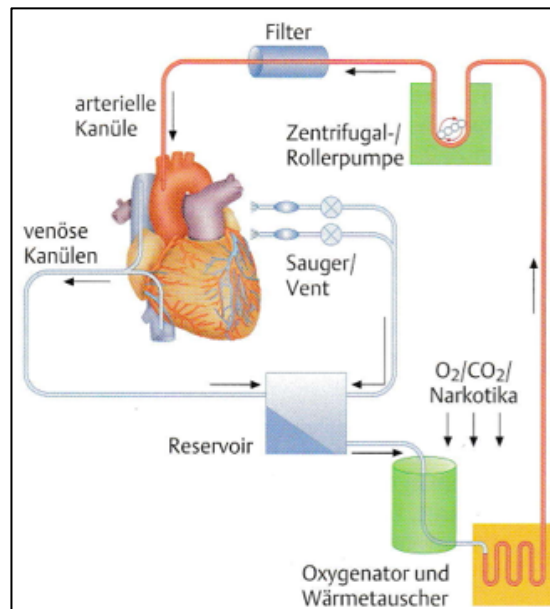


Abbildung 4-1 Prinzip einer Herz-Lungen-Maschine (Hirner und Weise, 2008)

schematische Darstellung der venösen Kanülierung beider Hohlvenen sowie der arteriellen Kanülierung der Aorta ascendens. Das Blut gelangt aus den Venae cavae zum Oxygenator, wird mit Sauerstoff angereichert und über den Wärmeaustauscher und die Rollerpumpe wieder dem Körper zugeführt.

Im Rahmen der Studie wurde beim Einlegen der venösen Kanülen der HLM ein kleines Stück des Atrium dextrum (Vorhofohr) entfernt. Die Probengewinnung aus dem Atrium sinistrum geschah im Zusammenhang mit Ablationen, Klappen- und aortokoronaren Bypass Operationen. Das Gewebestück wurde direkt nach Entnahme in kardioplegische Lösung überführt und anschließend in 3,7 % normal gepufferten Formalin nach Lillie fixiert. Die Fixierung dient der Stabilisierung der aktuellen Zellmorphologie.

Nach der Fixierung für 12 bis 48 Stunden erfolgte das Einbetten der Myokardproben mit Hilfe des Einbettautomaten nach dem in Tabelle 4-2 dargestellten Programm.

Tabelle 4-2 Programm des Einbettautomaten

Lösung	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Gepuffertes Formalin 4 %	60	35
Isopropanol 50 %	60	35
Isopropanol 70 %	60	35
Isopropanol 80 %	60	35
Isopropanol 96 %	60	35
Isopropanol 96 %	60	35
Isopropanol 100 %	60	35
Isopropanol 100 %	60	35
Xylol 100 %	30	35
Xylol 100 %	30	35
Paraffin	30	60
Paraffin	30	60
Paraffin	60	60
Paraffin	60	60

Nach 12 Stunden Laufzeit erfolgte das Einbetten der Proben in lipophile Paraffinblöcke, um anschließend mit Hilfe des Schlittenmikrotoms 1 µm dicke Schnitte anfertigen zu können. Diese dünne Schnittdicke vermied mögliche Überlagerungsartefakte. Die Paraffinblöcke kühlten vor dem Schneiden auf einer Kühlplatte für ca. eine Stunde auf bis -14 °C ab. Nach dem Schneiden folgte das Überführen des Präparates in zunächst ca. 20 °C-warmes destilliertes Wasser, um sich zu entfalten und später auf den Objektträger aufgezoogen zu werden. Um anschließend eventuelle Luftblasen zu entfernen, wurde der Objektträger mit dem Präparat in ca. 50 °C-heißes destilliertes Wasser gehalten und zügig herausgezogen, sodass das Präparat dicht am Objektträger anlag. Über Nacht trockneten die Präparate im Wärmeschrank bei 60 °C und lagerten anschließend bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei Raumtemperatur.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie besteht darin, mit Hilfe von Antikörpern bestimmte Zell- oder Gewebestrukturen nachzuweisen und zu lokalisieren. Das kann sowohl direkt als auch indirekt geschehen (s. Abbildung 4-2). Bei der direkten Immunhistochemie bindet ein Antikörper ein bestimmtes Antigen bzw. sein Epitop. Der Antikörper ist mit einem Farbstoff markiert, der die Zielstruktur

sichtbar macht. Handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom), spricht man von dem Vorgang der Immunfluoreszenz. Die hier verwendete indirekte Methode benötigt zwei Antikörper. Der Primärantikörper bindet das Antigen, jedoch trägt er keinen Farbstoff. Erst durch das Andocken eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper wird die Zielstruktur sichtbar.

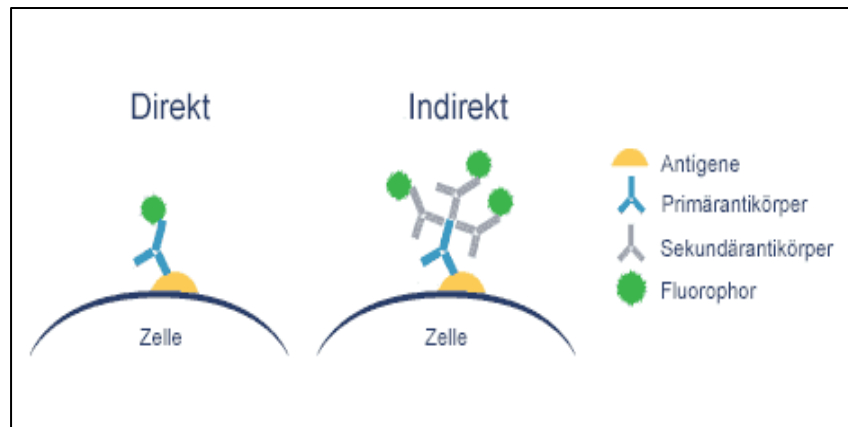


Abbildung 4-2 Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (abcam®, 2015)

Bei der direkten Methode (links) bindet ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Primärantikörper direkt an das Antigen. Bei der indirekten Methode (rechts) bindet zunächst ein Primärantikörper ohne Fluoreszenzfarbstoff an das Antigen und im zweiten Schritt ein Sekundärantikörper an den Primären zur Visualisierung des Antigens.

Es ist also eine Zweischnitt-Methode, die den Vorteil der Signalverstärkung und dadurch höheren Sensitivität hat. In dieser Arbeit fanden Doppelfluoreszenzfärbungen in Form der indirekten Immunfluoreszenz statt, indem Sekundärantikörper mit verschiedenen Farbstoffen genutzt wurden. Es begleiteten Negativkontrollen jede neu durchgeführte Fluoreszenzfärbung, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen.

4.3.2 Durchführung der Immunhistochemie

Die 1 µm dicken Schnitte entparaffinierten zunächst dreimal für je zehn Minuten in Xylol. Danach erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %) für jeweils fünf Minuten. Anschließend standen die Präparate fünf Minuten in destilliertem Wasser, um als nächsten Schritt zehn Minuten in der einfachen Pufferlösung TBS (pH 7,6) zu verweilen. Um die Zellen zu permeabilisieren, kochten die Präparate in 0,01 M Natrium-Citrat (pH 6) in der Mikrowelle bei 750 Watt für 30 Minuten. Danach wurden die Proben mit einem

Fettstift umrandet und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30 Minuten lang abgekühlt. Die weiteren Schritte fanden stets in einer feuchten Kammer statt, um ein Austrocknen des Gewebes und eine Veränderung der antigenen Strukturen zu vermeiden. Als Nächstes blockierte 2%iges BSA in einfachen TBS (pH 7,6) unspezifische Bindungen. Dieser Schritt dauerte eine Stunde. Nach dem Absaugen der BSA-Lösung mit Zellstoff erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers (s. Tabelle 4-3). Dieser wurde mit dem Antikörper-Diluent von DAKO verdünnt und inkubierte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.

Am nächsten Tag erfolgte zunächst das Aufwärmen der Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend fanden drei Waschschrte für jeweils fünf Minuten in einfachem TBS (pH 7,6) statt. Das weitere Prozedere geschah im Dunkeln, da die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper lichtsensitiv sind und bei mehrfacher Belichtung an Signalstärke abnehmen. Nach dem Waschen verblieb der Sekundärantikörper (s. Tabelle 4-3) für eine Stunde auf den Präparaten und inkubierte in der feuchten Kammer. Danach erfolgte das Waschen mit einfachem TBS (pH 7,6) dreimal für je fünf Minuten. Anschließend wirkte DAPI für eine Minute auf die Präparate ein, um die Nuclei anzufärben. Das DAPI wurde dazu mit einer Verdünnung von 1:500 mit einfachem TBS (pH 7,6) versetzt. Hieran schloss sich ein erneuter Waschschrte in einfachem TBS (pH 7,6) für fünf Minuten an. Zum Schluss wurde der Fettstift entfernt und die Präparate wurden mit DAKO-fluorescent Mounting Medium eingedeckelt. Nach einer Stunde Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen mit Nagellack umrandet, um ein Austrocknen und Luftziehen der Präparate zu verhindern. Die Objektträger lagerten trocken und im Kühlschrank bei 4 °C.

Tabelle 4-3 verwendete Antikörper und ihre Verdünnung

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-GM 130 (rabbit polyclonal)	1: 1250	Goat-anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 555,	1: 1000
α -Tubulin (rat monoclonal)	1: 120	Goat-anti-rat IgG Alexa Fluor® 488,	1: 500
Cdk 5 (goat polyclonal)	1: 100	Donkey-anti-goat IgG Alexa Fluor® 555,	1: 1000
phospho-GM 130 (rabbit polyclonal)	1: 100	Donkey-anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 488,	1: 500
Anti-Stathmin1(p-S37) (rabbit polyclonal)	1: 250	Donkey-anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 555,	1: 1000

4.4 Mikroskopische Bildverarbeitung

4.4.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Eine Lichtquelle, in diesem Fall eine Quecksilberdampfampe, sendet ein breites Spektrum an Wellenlängen aus (s. Abbildung 4-3). Ein Anregungsfilter isoliert diese Wellenlängen, sodass nur eine einzige durch den Filter tritt, z. B. Blaulicht. Dieses sogenannte Anregungslicht trifft nun auf einen Strahlteiler, oder auch Farbteiler genannt, der das Licht als dichromatischer Spiegel reflektiert und auf das Objekt lenkt. Das Licht regt die Fluorochrome des Sekundärantikörpers an und diese senden nun selbst Fluoreszenzlicht aus, welches wiederum auf den Spiegel trifft. Da das emittierte Licht nun eine längere Wellenlänge hat als das Anregungslicht, wird es nicht reflektiert, sondern durch den Spiegel durchgelassen und erreicht den Detektionsfilter. Er filtert das Licht erneut, bis es über das Okular für das menschliche Auge sichtbar ist.

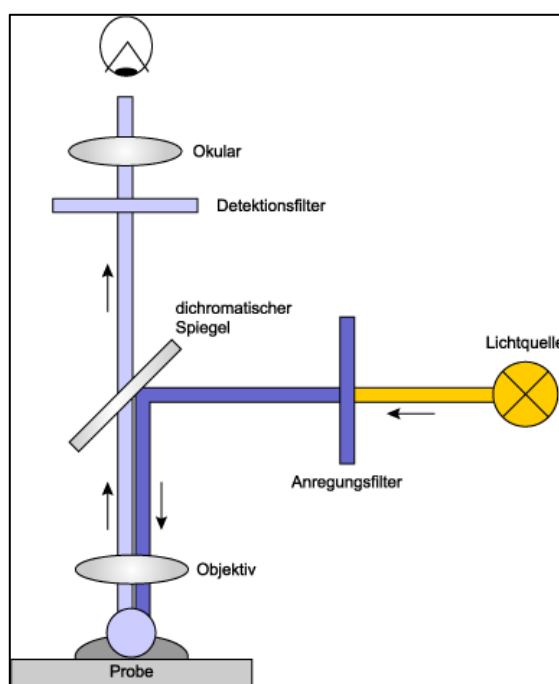


Abbildung 4-3 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes (Hirtz, 2015)

Das von einer Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht wird durch einen dichromatischen Spiegel auf das Objekt gelenkt. Durch Anregung der Fluorochrome des Präparates entsteht ein Emissionslicht, welches durch den Spiegel hindurch über einen Detektionsfilter dem menschlichen Auge sichtbar wird.

Das Betrachten der Färbungen erfolgte mit dem Auflicht-Immunfluoreszenzmikroskop Axioplan 2 von Zeiss. Das Mikroskop ist mit

Trockenobjektiven der Vergrößerungsstufen 5 x, 10 x, 20 x, 40 x sowie einem Immersionsobjektiv mit der Vergrößerung 100 x ausgestattet. Die Bildaufnahme mit der Kamera AxioCam MRc5 geschah stets mit dem 100 x Objektiv, das zusammen mit dem 10 x Okular eine Vergrößerung von 1000 x ergab (Objektvergrößerung · Okularvergrößerung).

Die numerische Apertur (n. A.) als dimensionslose Größe gibt die Lichtaufnahmekapazität des Objektivs an. Sie ist abhängig von dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Deckglas und Objektiv sowie dem halben Öffnungswinkel α des Objektivs (Mulisch und Welsch, 2010).

$$n. A. = n \cdot \sin \alpha$$

Das verwendete Zeiss Immersionsöl 518 F hat einen Brechungsindex von 1,518. Der halbe Öffnungswinkel des 100 x Objektivs beträgt $58,91^\circ$, sodass sich nach oben genannter Formel eine numerische Apertur von 1,3 ergibt.

Auf Basis der numerischen Apertur lässt sich nun das theoretisch erzielbare Auflösungsvermögen des Objektivs D errechnen, also die Fähigkeit des Objektivs zwei Punkte als getrennt wahrzunehmen.

$$D = \frac{\lambda}{n. A.}$$

In dieser Arbeit wurde zum einen der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 benutzt. Dieser emittiert eine Wellenlänge von $\lambda = 515 \text{ nm}$, die grünem Licht des sichtbaren Spektralbereiches entspricht. Somit errechnet sich für das 100 x Objektiv mit der numerischen Apertur von 1,3 ein Auflösungsvermögen von $0,40 \text{ }\mu\text{m}$. Zum anderen wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor 555 verwendet, welcher eine Wellenlänge von $\lambda = 585 \text{ nm}$ des roten Spektralbereich emittiert. Für diesen Antikörper lässt sich ein Auflösungsvermögen von $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ bestimmen. Laut Mulisch und Welsch (2010) muss noch wegen des Kondensors mit geöffneter Kondensorblende ein Korrekturfaktor von 0,61 in die Berechnung mit einfließen:

$$D = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n. A.}$$

Schlussfolgernd ergibt sich also eine mikroskopische Auflösungsgrenze von $D = 0,24 \mu\text{m}$ für die im grünen Spektralbereich betrachteten Zellbestandteile und $D = 0,27 \mu\text{m}$ für die im roten Spektralbereich untersuchten Zellkomponenten.

4.4.2 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie

Das Mikroskopieren erfolgte wegen der lichtsensitiven Immunfluoreszenzfärbungen stets im Dunkeln, um eine vorschnelle Fluoreszenzabnahme der Schnitte zu verhindern. Nach einem Überblick über das gesamte Präparat wurden fünf Zellen pro Präparat in 1000-facher Vergrößerung mit der Kamera aufgenommen. Während der Digitalisierung jedes einzelnen Bildes entstand ein Foto mit 512×512 Pixel. Jedes dieser Pixel besteht aus einem 8-Bit System und kann somit 256 unterschiedliche Graustufen einnehmen. 0 ist dabei als Schwarz definiert und 255 als helles Weiß. Insgesamt fanden drei verschiedene Doppelfluoreszenzfärbungen statt: Anti-GM 130 zusammen mit α -Tubulin, Anti-Stathmin zusammen mit α -Tubulin und Cdk 5 zusammen mit phospho-GM 130.

4.5 Bildauswertung

4.5.1 Auswertung Anti-GM 130 und α -Tubulin

Die Auswertung der Doppelfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem Programm Zen lite 2011 von Zeiss. Es wurde eine Strecke x definiert, indem x der Abstand vom Nucleus zur nächstgelegenen Zellmembran darstellte (s. Abbildung 4-4). Dieser Abstand x wurde in alle vier Richtungen vom Nucleus abgetragen, sodass eine Einteilung in zwei laterale und zwei polare Flächen bezogen auf den Zellkern entstand.

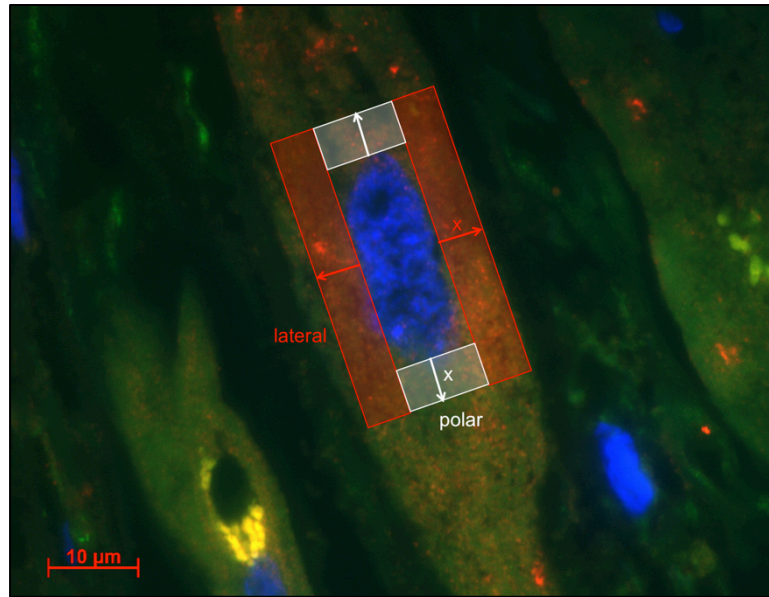


Abbildung 4-4 Auswertung Immunfluoreszenz Anti-GM 130 und α -Tubulin

blau: Ncl., grün: α -Tubulin, rot: Anti-GM 130, x ist der Abstand vom Ncl. zur nächstgelegenen Zellmembran, somit entstehen zwei laterale (rot) und zwei polare (weiß) Flächen in Bezug auf den Ncl., Vergleich der roten und weißen Fläche nach vier Gesichtspunkten (s. Text), 1000-fache Vergrößerung

Die Auswertung dieser Färbung ergab sich nach vier Gesichtspunkten:

1. Intensitätsmessung: In dem definierten Bereich wurde die rote Fluoreszenzintensität (Anti-GM 130) gemessen. Laut Programmhersteller galt dabei die Bedingung: Der Mittelwert der Intensität ergibt sich aus der Summe aller Grauwerte dividiert durch die Gesamtanzahl der Pixel:

$$\text{Mittelwert Intensität} = \frac{\sum \text{Grauwerte Kanal 1}}{\text{Fläche Kanal 1}}$$

Nach der Intensitätsmessung wurden die Werte der zwei lateralen Flächen und die der zwei polaren Flächen addiert. Anschließend erfolgte die Bildung eines Quotienten aus der Rotintensität lateral/Rotintensität polar, um eine Ratio zu erhalten.

2. Zählen der einzelnen Golgifragmente in dem festgelegten Bereich

3. Größenmessung der einzelnen Golgikomponenten: Die Größenmessung der Fragmente fand nur in dem in Abbildung 4-4 definierten Bereich statt. Durch Umfahren der einzelnen Fragmente konnte das Bildverarbeitungsprogramm eine Fläche errechnen. Pro Zelle ergab sich dann aus fünf ausgewählten Fragmenten ein arithmetischer Mittelwert der Golgifragmente. Bei größeren Flächen-

abweichungen der einzelnen Fragmente wurden zehn Komponenten gemittelt, um eine Aussage treffen zu können.

4. Zählen der Tubulinfilamente: In jeder Zelle erfolgte das manuelle Zählen der einzelnen Tubulinfilamente, die länger als zehn μm waren, da dies der physiologischen Länge des zytoskeletalen Bestandteils entspricht (Alberts et al., 2007). Zur Bestimmung der Tubulinlänge wurde das Programm Zen lite 2011 von Zeiss verwendet.

4.5.2 Auswertung Anti-Stathmin und α -Tubulin

Die Auswertung dieser Färbung geschah ebenfalls mit dem Programm Zen lite 2011. Pro Zelle wurde ein perinukleärer Raum definiert (s. Abbildung 4-5). Dieser Raum entstand, indem eine Kontur, fünf μm vom Nucleus entfernt, um den Zellkern gelegt wurde. Das Bildverarbeitungsprogramm maß die rote Farbintensität (Anti-Stathmin, phospho S37) perinukleär sowie die der gesamten Zelle, sodass anschließend ein Verhältnis aus der Rotintensität perinukleär/Rotintensität gesamte Zelle gebildet werden konnte. Der perinukleäre Raum wurde betrachtet, um eventuelle Zusammenhänge mit dem GA und seiner Fragmentierung festzustellen. Die Auswertung von Tubulin fand bereits bei der Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-GM 130 statt (vgl. Kapitel 4.5.1), sodass sie bei dieser Färbung vernachlässigt werden konnte.

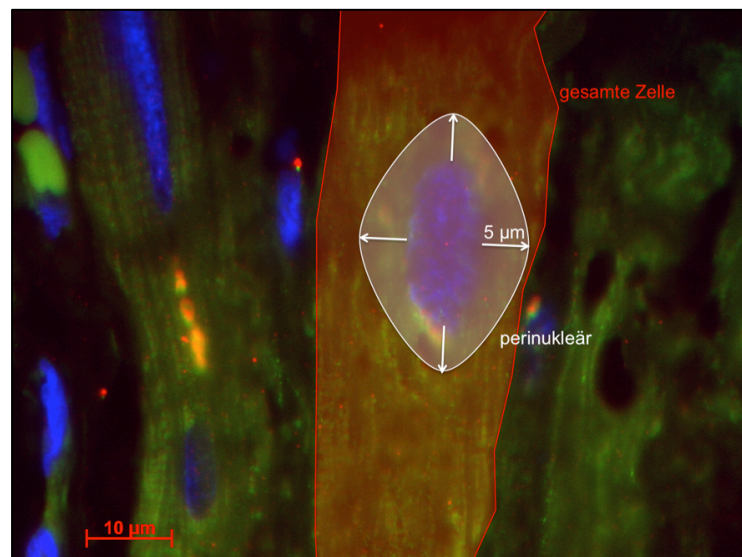


Abbildung 4-5 Auswertung Immunfluoreszenz Anti-Stathmin und α -Tubulin

blau: Ncl., grün: α -Tubulin, rot: Anti-Stathmin, Festlegen eines perinukleären Raumes (weiß) mit 5 μm Abstand vom Ncl., Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen der gesamten Zelle (rot) und des Raumes um den Ncl, 1000-fache Vergrößerung

4.5.3 Auswertung Cdk 5 und phospho-GM 130

Die Auswertung geschah mit dem Programm Axio Vision 4.8.2. von Zeiss. Bei der zu analysierenden Zelle wurde zunächst der Zellumfang bestimmt, indem das Bildverarbeitungsprogramm die Zelle mit Hilfe des Befehls „Kontur“ umrandete (s. Abbildung 4-6). Die Zellumrandung galt im weiteren Verlauf als Zellmembran. Danach wurden die Längen der Strecken gemessen, an denen die rote Farbinsintensität (Cdk 5) der Zellmembran anlag. Diese Strecken wurden gemessen, weil die Cdk 5 in ihrem aktivierten Zustand an p35/p39 gebunden und in der Zellmembran verankert ist (Shukla et al, 2012). Anschließend wurden die einzelnen Streckenabschnitte addiert und eine Ratio gebildet, indem der Quotient aus dem Umfang der membranären Cdk 5 und dem Umfang der gesamte Zelle errechnet wurde. Die Färbung von phospho-GM 130 ergab keine Unterschiede zwischen den VHF Proben und den SR Proben, sodass dazu keine Auswertung erfolgte.

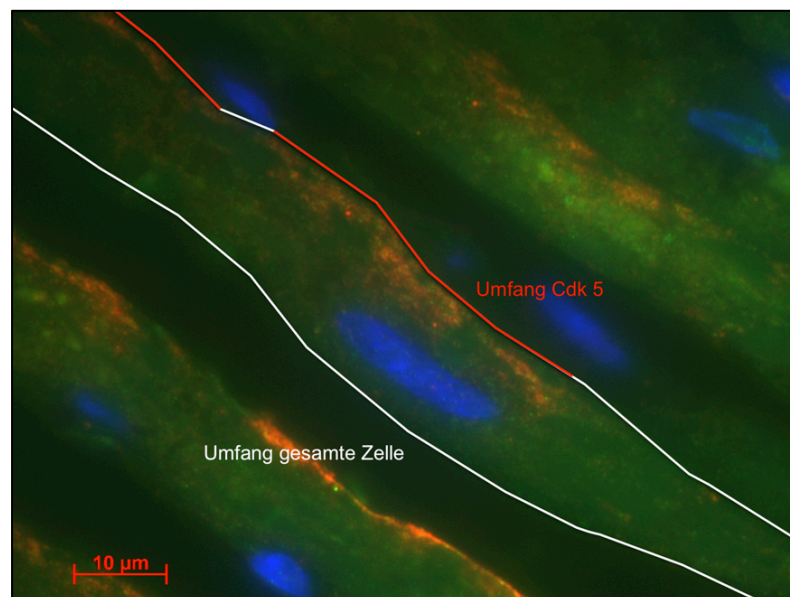


Abbildung 4-6 Auswertung Immunfluoreszenz Cdk 5 und phospho-GM 130

blau: Ncl., grün: phospho-GM 130, rot: Cdk 5, Messung des Umfangs der gesamten Zelle (weiß) und Messung der Strecken, an denen die Cdk 5 der Zellmembran anliegt (rot), 1000-fache Vergrößerung

4.6 Konfokalmikroskopie

4.6.1 Grundlagen der Konfokalmikroskopie

Das Prinzip der Konfokalmikroskopie ist ähnlich dem der Fluoreszenzmikroskopie. Als Lichtquelle dient allerdings ein Argon-Krypton-Laser. Ein weiterer Unterschied ist, dass das Bild Pixel für Pixel in einem Bildverarbeitungsprogramm entsteht. Der Laser beleuchtet also nicht das gesamte Präparat, sondern immer nur einen kleinen Teil, der schrittweise in Schichten gerastert wird. Zuständig dafür ist eine Lochblende, die nur das Licht durchlässt, das genau aus der Brennebene stammt. Alles andere Licht blendet sie aus und filtert somit eventuell vorhandene Hintergrundfluoreszenzen heraus.

4.6.2 Durchführung der Konfokalmikroskopie

Diese Methode fand zusätzlich zur Fluoreszenzmikroskopie statt, um die Zellbestandteile in einer weiteren Ebene, nämlich in der Z-Achse zu betrachten. Die Konfokalmikroskopie ermöglichte eine Darstellung der räumlichen Verteilung der einzelnen Zellkomponenten innerhalb der Kardiomyozyten. Diese Methode erfolgte stichprobenartig für sechs Proben aus der Gruppe VHF und sechs Proben aus der Gruppe SR. Dazu wurden 14 µm dicke Schnitte angefertigt und mit den Antikörpern Anti-GM 130 sowie α -Tubulin gefärbt. Für die Untersuchungen fand das Mikroskop von Zeiss LSM 510 in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Heike Franke vom Rudolph-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig Anwendung. Alle Präparate wurden mit dem 100 x Immersionsobjektiv angeschaut und mit dem Programm Zen lite 2009 in Form von Z-Stack Bildern aufgenommen. Die konfokalmikroskopische Untersuchung erfolgte nur stichprobenartig, da es aufgrund der dünnen Probenschnittdicke von 1 µm nicht nötig war, alle Präparate mit der Konfokalmikroskopie zu betrachten. Es hätte so auch keine bessere Auflösung der Zellen erreicht werden können, sodass diese Untersuchung lediglich als zusätzliche Methode eingesetzt wurde, um die Verteilung der Golgifragmente innerhalb der Zelle auch in der dritten Dimension zu erkennen.

4.7 Lineare Korrelationen

Wie Tabelle 4-1 zeigt, gab es mehrere Kriterien zwischen denen sich die Patienten aus den Gruppen SR und VHF unterschieden. Die Patienten differenzierten sich nicht nur in der Diagnose SR oder VHF, sondern auch signifikant in der Ejektionsfraktion (EF) des Herzens und in dem Diameter des linken Vorhofs. Um zu zeigen, dass diese Kriterien aber keinen Einfluss auf die folgenden Ergebnisse haben, wurden lineare Korrelationen erstellt (s. Kapitel 5.5.1). Weitere lineare Korrelationen wurden errechnet, um eventuelle Zusammenhänge und Abhängigkeiten zwischen den in der Arbeit gewonnen histologischen Ergebnissen rechnerisch zu belegen (s. Kapitel 5.5.2).

R^2 ist das Bestimmtheitsmaß der linearen Korrelation und das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten R . Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt an, wie gut die abhängigen Y-Werte die Varianz der unabhängigen X-Werte vorhersagen bzw. erklären können. R^2 kann Werte zwischen Null und Eins annehmen. Der Wert Eins besagt, dass eine vollkommene Korrelation bzw. ein kompletter funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Variablen besteht. Ist das Bestimmtheitsmaß Null, liegt kein linearer bzw. funktioneller Zusammenhang zwischen den zwei Variablen X und Y vor (Papula, 2008). Die genaueren Grenzen bzw. Kriterien für R^2 sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-4 Einteilung für das Bestimmtheitsmaß R^2 (Martens, 2003)

Bestimmtheitsmaß R^2	Zusammenhang
0	keiner
0-0,2	sehr gering
0,2-0,5	gering
0,5-0,7	mittel
0,7-0,9	hoch
0,9-1	sehr hoch
1	total

4.8 Statistik

Für die statistische Auswertung fand das Programm SPSS Statistics Anwendung. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von n Experimenten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den t-Test für unabhängige Variablen und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests für die Patientenpopulation. Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Immunfluoreszenzfärbung von Anti-GM 130 und α -Tubulin

5.1.1 Fluoreszenzintensitätsmessung von Anti-GM 130 als Golgi-Apparat Marker

Um den GA darzustellen, wurde das Marker Protein Anti-GM 130 gewählt, welches ein cis-Matrixprotein ist. Es richtet sich gegen die Membranen des GA. Bereits während des Mikroskopierens konnten deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen SR und VHF beobachtet werden. Die Untersuchung der Proben zeigte, dass der GA bei den Schnitten aus der VHF Gruppe eine veränderte Morphologie und Lokalisation bezüglich des Ncl. aufwies, verglichen mit den Proben der Patienten mit SR. So lag der GA bei der SR Gruppe dicht und kompakt am Zellkernpol. Bei den VHF Proben hingegen war der GA zersplittert und nicht mehr kompakt. Er befand sich nicht nur am Zellkernpol, sondern auch neben dem Ncl. sowie innerhalb der gesamten Zelle verteilt (s. Abbildung 5-1). Es fällt auf, dass der GA bei der Kontrollgruppe überwiegend polar statt lateral vorliegt. Die Methode zur Auswertung dieser Bilder ist in Kapitel 4.5.1 dargestellt.

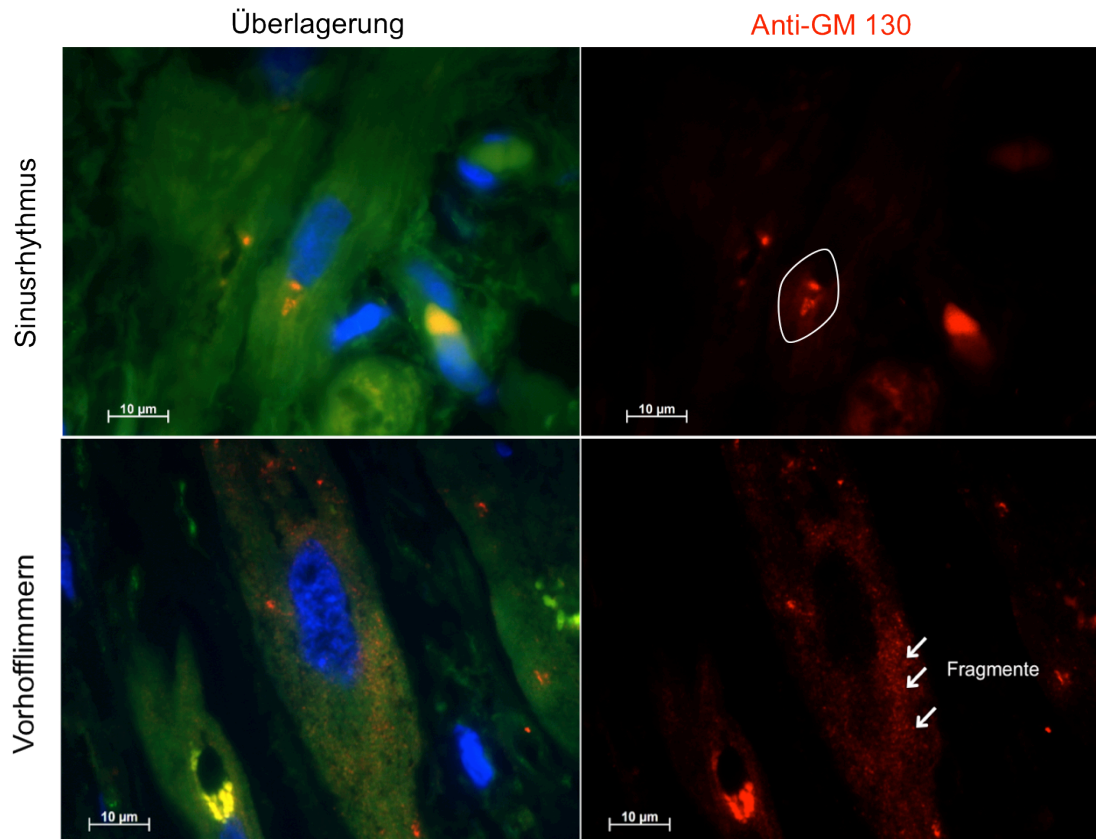


Abbildung 5-1 Darstellung von Anti-GM 130 bei SR und VHF

blau: Ncl., grün: α -Tubulin, rot: Anti-GM 130, Lokalisation und Morphologie des GA bei SR (weißer Kreis) und bei VHF (weiße Pfeile), 1000-fache Vergrößerung, Maßstabbalken entspricht 10 µm

Da einige wenige der SR Vorhofproben sowohl aus dem RA als auch aus dem LA stammten (zutreffend für sechs Gewebeschnitte, s. Kapitel 4.1), wurde zunächst gezeigt, dass die Unterschiede zwischen links und rechts bezüglich der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 nicht signifikant sind (s. Diagramm 5-1).

Die Ratio Rot-Intensität lateral/polar zeigte bei den SR Proben aus dem LA einen Mittelwert von $0,76 \pm 0,03$ und für Proben aus dem RA $0,61 \pm 0,09$. Die Unterschiede waren mit $p = 0,196$ nicht signifikant. So musste keine Unterscheidung der Ergebnisse in RA und LA erfolgen. Mit dieser Erkenntnis ließen sich die Ergebnisse des RA und LA in der SR Gruppe zusammenfassen.

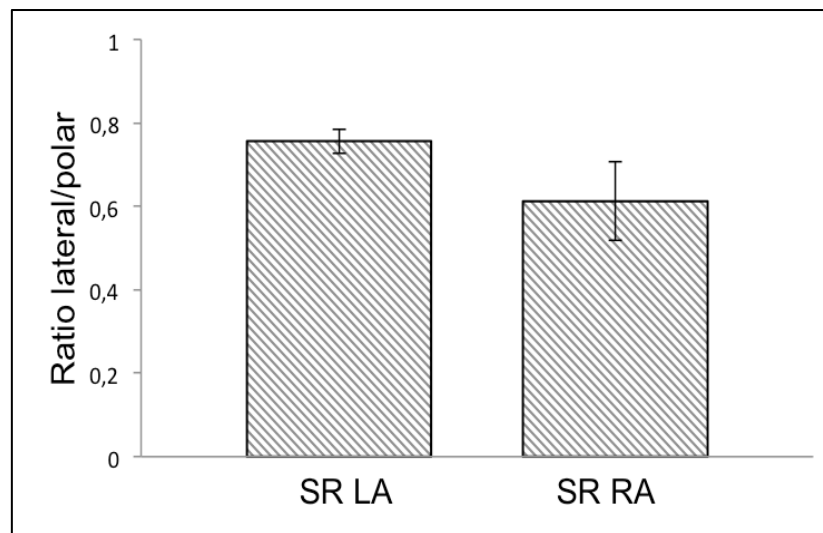


Diagramm 5-1 Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 im rechten und linken Atrium der SR Gruppe

Ratio lateral/polar für das linke Atrium (LA) $0,76 \pm 0,03$, $n = 6$ und für das rechte Atrium (RA) $0,61 \pm 0,09$, $n = 6$, $p = 0,196$

Da sich bei den SR Proben lateral eine niedrigere Rot-Intensität als polar zeigte (s. Diagramm 5-2), ergab die Ratio Rot-Intensität lateral/Rot-Intensität polar in der SR Gruppe signifikant niedrigere Werte ($0,73 \pm 0,03$) als bei VHF ($0,88 \pm 0,009$).

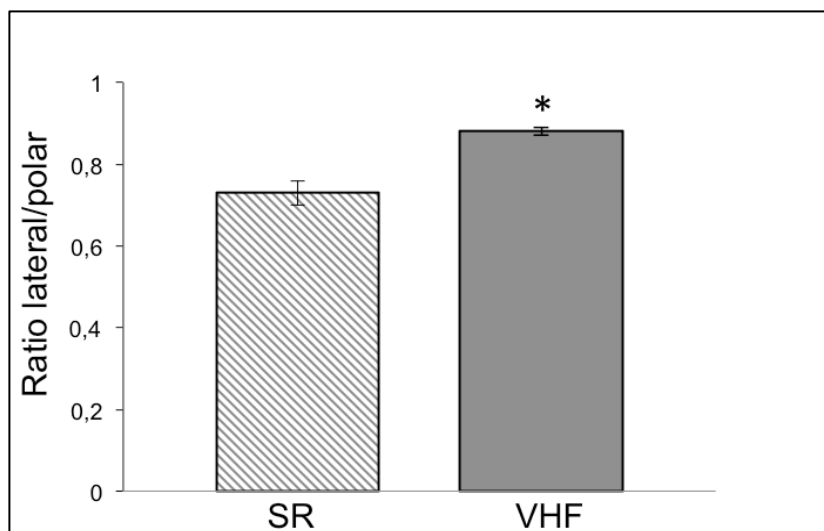


Diagramm 5-2 Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 für SR und VHF

Ratio lateral/polar für SR $0,73 \pm 0,03$ mit $n = 24$ und für VHF $0,88 \pm 0,009$ mit $n = 129$, $* p < 0,01$

5.1.2 Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente

Weiterhin konnte eine veränderte Anzahl der GA Fragmente zwischen beiden Gruppen beobachtet werden. Abbildung 5-1 verdeutlicht die veränderte Morphologie des GA bei VHF. Es kam zu einer unterschiedlichen Anzahl von GA Fragmenten zwischen den Gruppen SR und VHF. Für eine quantitative Auswertung wurden die Fragmente, die sich in dem auszuwertenden Bereich befanden (s. Abbildung 4-4), manuell gezählt.

Da auch bei dieser Untersuchung die SR Proben aus dem rechten sowie linken Vorhof stammten, erfolgte zunächst die getrennte Darstellung der Anzahl der GA Fragmente für das LA und RA (s. Diagramm 5-3). Bei den gesunden Proben kamen im LA im Mittel $23,5 \pm 4,57$ Fragmente in dem definierten Zellbereich vor, im RA $22,93 \pm 4,55$. Die Unterschiede waren mit $p = 0,932$ nicht signifikant.

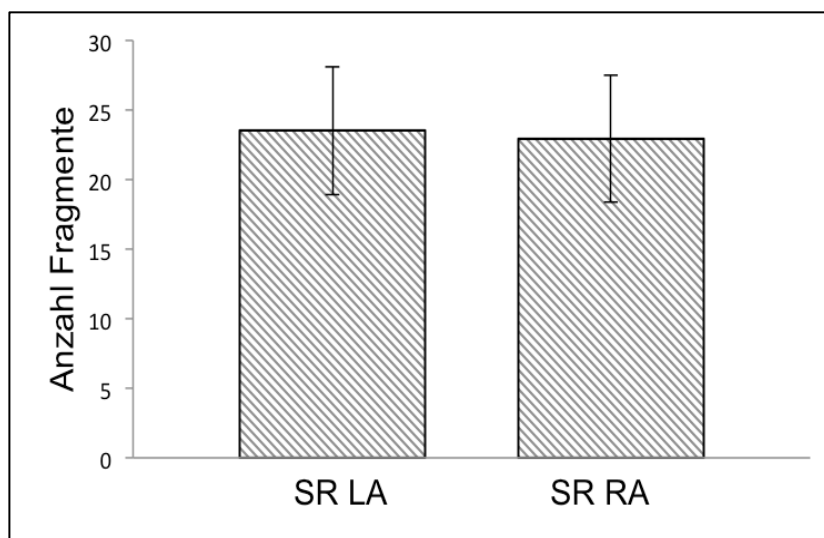


Diagramm 5-3 Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente im rechten und linken Atrium für SR
Anzahl der Fragmente im LA $23,5 \pm 4,57$, $n = 6$ und im RA $22,93 \pm 4,55$, $n = 6$, $p = 0,932$

Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede zwischen RA und LA in der SR Gruppe ließen sich die Ergebnisse zusammenfassen, sodass im Folgenden zwischen SR und VHF unterschieden wurde. In dem in Abbildung 4-4 definierten Auswertungsbereich der Zelle fanden sich bei der gesunden Kontrollgruppe deutlich weniger Fragmente des GA als bei der erkrankten Gruppe (s. Diagramm 5-4). Der Mittelwert der einzelnen gezählten Komponenten lag für die SR Proben bei $23,4 \pm 1,88$ und für die VHF Proben bei $52,5 \pm 1,9$. Die Unterschiede waren mit

$p < 0,001$ signifikant. Für eine detailliertere Darstellung zeigt Diagramm 5-5 die Lage- und Streuungsmaße der Daten für beide Gruppen in Form von Boxplots.

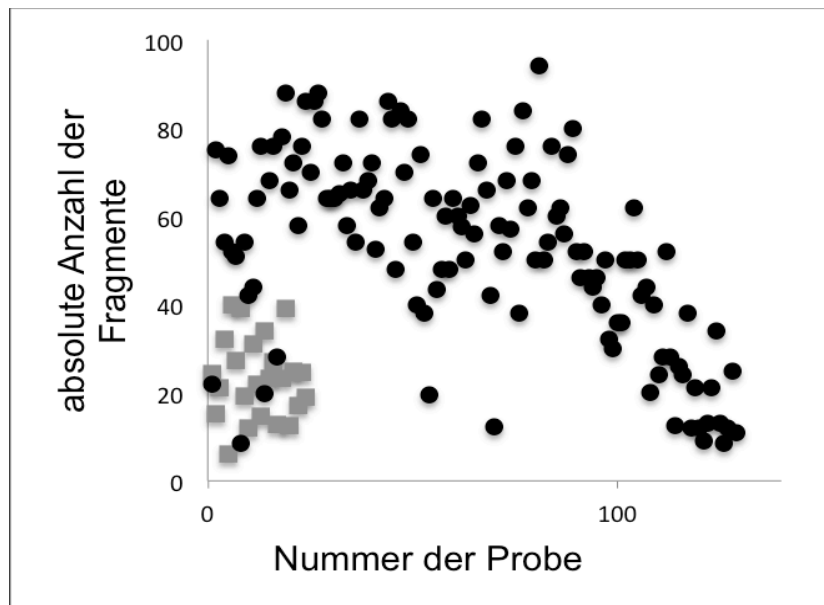


Diagramm 5-4 Absolute Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente bei SR und VHF

graue Vierecke: gezählte Fragmente in dem definierten Bereich für SR $23,4 \pm 1,88$ ($n = 24$)

schwarze Punkte: gezählte Fragmente für VHF $52,5 \pm 1,9$ ($n = 129$), $p < 0,001$

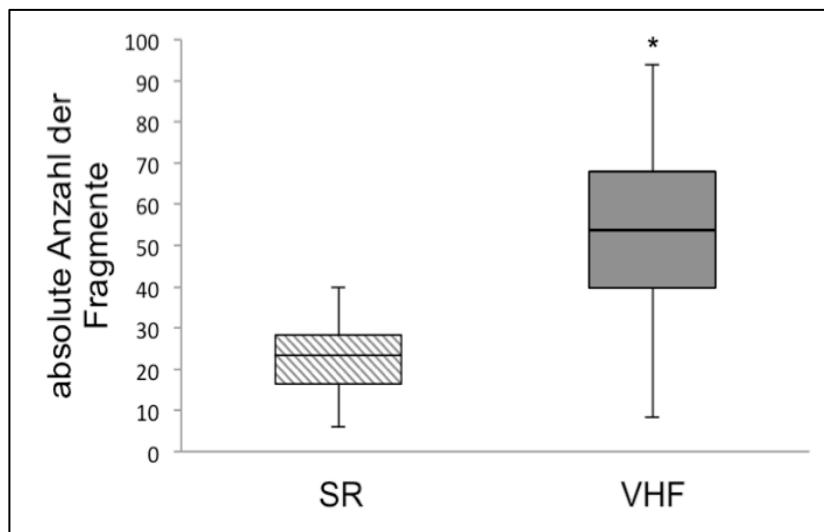


Diagramm 5-5 Absolute Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente bei SR und VHF in Form von Boxplots

links: gezählte Fragmente in dem definierten Bereich für SR, Median 23,3, Q1 16,55, Q3 28,25, Minimum 6, Maximum 40, $n = 24$

rechts: gezählte Fragmente für VHF, Median 54, Q1 40, Q3 68, Minimum 8,4, Maximum 94, $n = 129$, * $p < 0,001$

5.1.3 Größe der Golgi-Apparat Fragmente

Neben der Anzahl der einzelnen GA Komponenten pro Zelle wurde auch die Größe untersucht. Die Bilder der SR Proben zeigten größere GA Bestandteile in dem festgelegten zu analysierenden Bereich (s. Abbildung 4-4). Bei den VHF Proben hingegen erschienen die Bestandteile kleiner. Pro Zelle wurde aus der Größe von fünf Fragmenten der arithmetische Mittelwert gebildet und dieser dann als einzelner Wert in die Gesamtbetrachtung der Gruppen SR und VHF einbezogen.

Auch bei der Untersuchung erfolgte zunächst die Differenzierung der Größe der GA Fragmente für das LA und RA in der SR Gruppe (s. Diagramm 5-6). Der Quotient der Fragmentgröße bezogen auf die auszuwertende Fläche ergab im LA $0,18 \% \pm 0,05 \%$ und im RA $0,25 \% \pm 0,1 \%$. Es lag keine Signifikanz vor ($p = 0,567$).

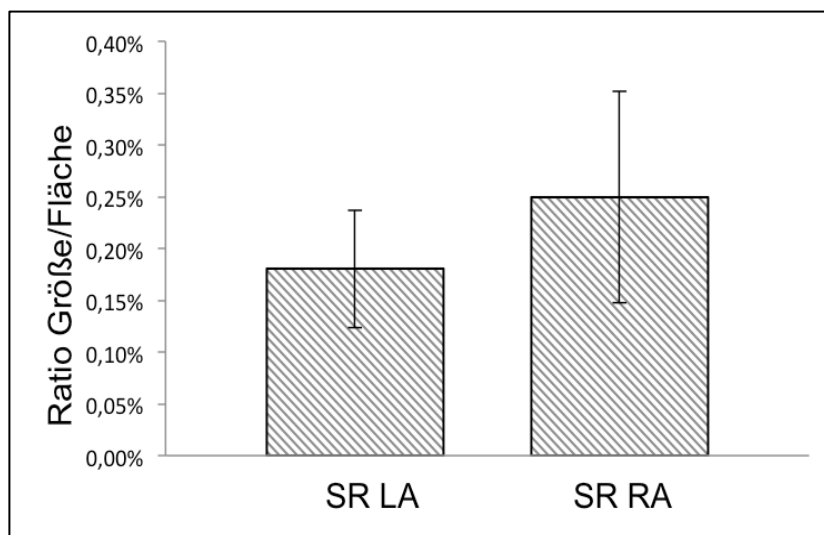


Diagramm 5-6 Größe der Golgi-Apparat Fragmente pro komplette Fläche lateral + polar im rechten und linken Atrium für SR

Ratio der Größe der einzelnen Fragmente bezogen auf die Fläche für SR, für LA $0,18 \% \pm 0,05 \%$, $n = 6$ und für RA $0,25 \% \pm 0,1 \%$, $n = 6$, $p = 0,567$

Aufgrund dieses Ergebnisses konnten die beiden Gruppen SR und VHF ohne Zuordnung zum entsprechenden Vorhof verglichen werden (s. Diagramm 5-7). Für die Untersuchungen der SR Proben ergaben die Größenwerte der Fragmente bezogen auf die definierte Fläche (s. Abbildung 4-4) ein Verhältnis von $0,2 \% \pm 0,033 \%$ und für die VHF Proben $0,05 \% \pm 0,004 \%$. Mit einem p-Wert von 0,01 war das Ergebnis signifikant. Für eine detailliertere Darstellung zeigt

Diagramm 5-8 in Form von Boxplots die Lage- und Streuungsmaße der Daten für beide Gruppen.

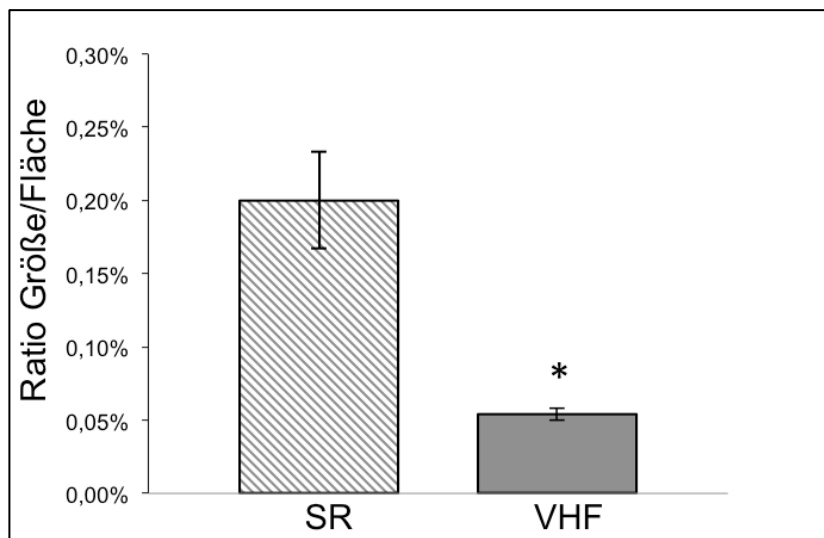


Diagramm 5-7 Größe der Golgi-Apparat Fragmente pro komplette Fläche lateral + polar für SR und VHF

Ratio Größe der einzelnen Bestandteile bezogen auf die Fläche, für SR 0,2 % \pm 0,033 % mit n = 24 und für VHF 0,05 % \pm 0,004 % mit n = 129, * p < 0,01

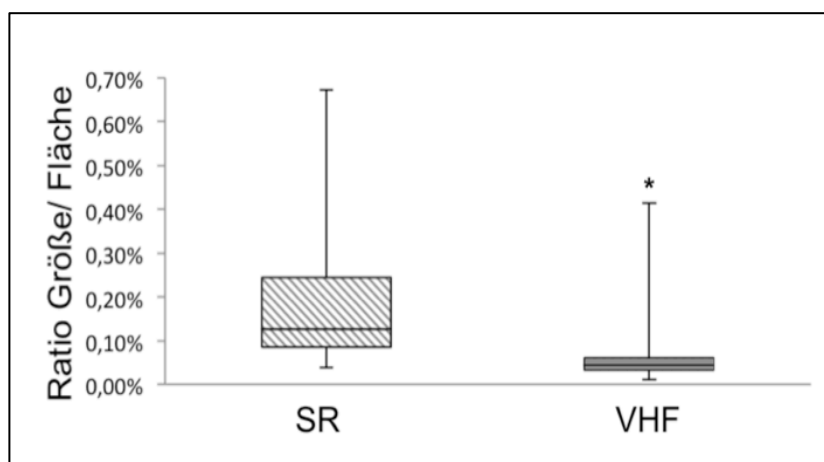


Diagramm 5-8 Größe der Golgi-Apparat Fragmente pro komplette Fläche lateral + polar für SR und VHF in Form von Boxplots

links: Größe der Fragmente in dem definierten Bereich für SR, Median 0,13 %, Q1 0,09 %, Q3 0,25 %, Minimum 0,04 %, Maximum 0,67 %, n = 24

rechts: Größe der Fragmente für VHF, Median 0,04 %, Q1 0,03 %, Q3 0,06 %, Minimum 0,01 %, Maximum 0,42 %, n = 129, * p < 0,01

5.1.4 Anzahl der Tubulinfilamente

In der letzten Untersuchung dieser Doppelfluoreszenzfärbung wurde α -Tubulin betrachtet, welches ein Bestandteil der Tubulinfilamente ist (s. Abbildung 5-2). Bei den gesunden SR Proben waren die Filamente gut zu erkennen und erschienen stabil. Weiterhin zeigte sich eine hohe Anzahl an Tubulinfilamenten, die die vorgegebene Länge von $\geq 10 \mu\text{m}$ aufwiesen. Bei den VHF Proben hingegen wirkten die Tubulinfilamente in ihrer Struktur zerstört und fragmentiert. Es fanden sich wenige bis gar keine Filamente pro Zelle, die eine Länge von $\geq 10 \mu\text{m}$ erreichten. Der Betrachtungswert von $10 \mu\text{m}$ wurde gewählt, da dies der physiologischen Länge des zytoskeletalen Bestandteils innerhalb von Kardiomyozyten entspricht (Alberts et al., 2007).

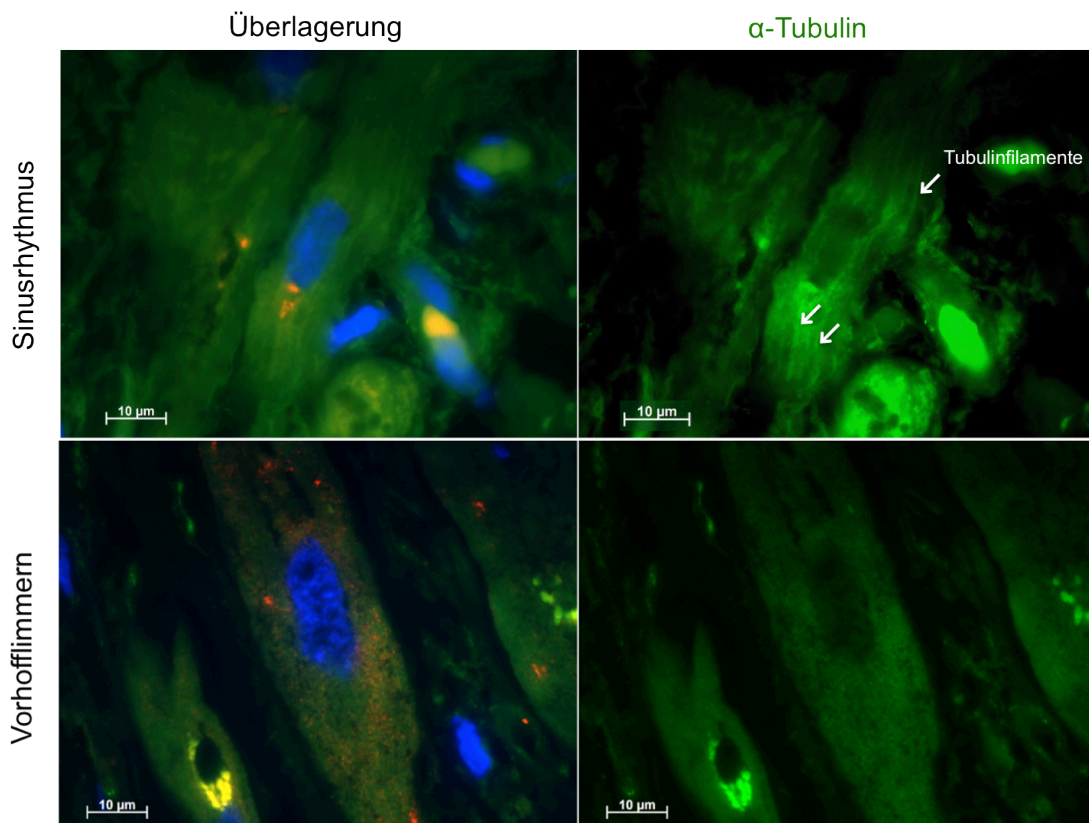


Abbildung 5-2 Darstellung von α -Tubulin bei SR und VHF

blau: Ncl., grün: α -Tubulin, rot: Anti-GM 130, Morphologie der Tubulinfilamente bei SR (weiße Pfeile) und VHF, 1000-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht $10 \mu\text{m}$

Diagramm 5-9 zeigt zunächst die nicht signifikanten Unterschiede zwischen dem LA und RA in der SR Gruppe in Bezug auf die Tubulinfilamentlänge pro Zelle. In der gesunden Kontrollgruppe ergaben sich für das LA durchschnittlich $4,83 \pm 0,88$

Tubulinfilamente mit der vorgegebenen Länge von $\geq 10 \mu\text{m}$ und für das RA $2,93 \pm 0,71$. Die Werte unterschieden sich mit $p = 0,124$ nicht signifikant.

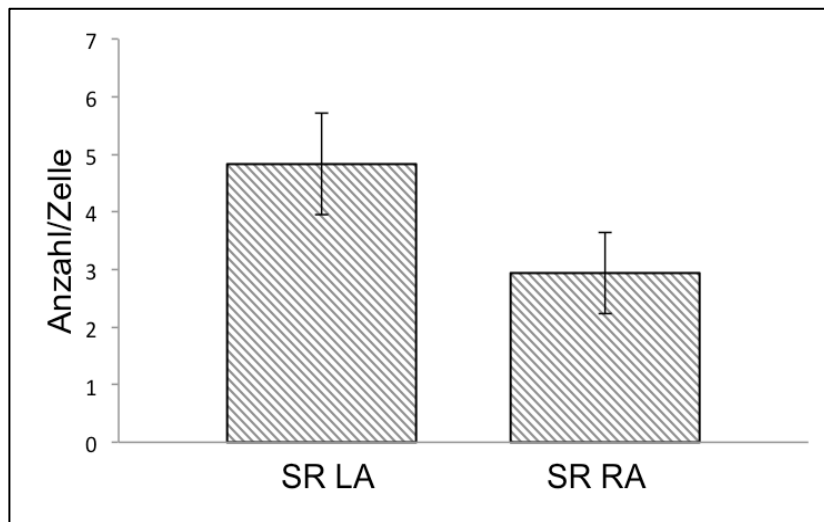


Diagramm 5-9 Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ im rechten und linken Atrium für SR

Anzahl der Tubulinfilamente pro Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ für die SR Gruppe, im LA $4,83 \pm 0,88$, $n = 6$ und im RA $2,93 \pm 0,71$, $n = 6$, $p = 0,124$

Analog zu den vorherigen Analysen wurden innerhalb der SR Gruppe beide Vorhöfe gemeinsam betrachtet. Diagramm 5-10 stellt den Vergleich zwischen SR und VHF grafisch dar. Es wird deutlich, dass beim SR mehr Filamente mit der Länge $\geq 10 \mu\text{m}$ vorkamen ($3,87 \pm 0,44$) als beim VHF ($2,17 \pm 0,14$). Die Werte waren mit $p < 0,001$ signifikant.

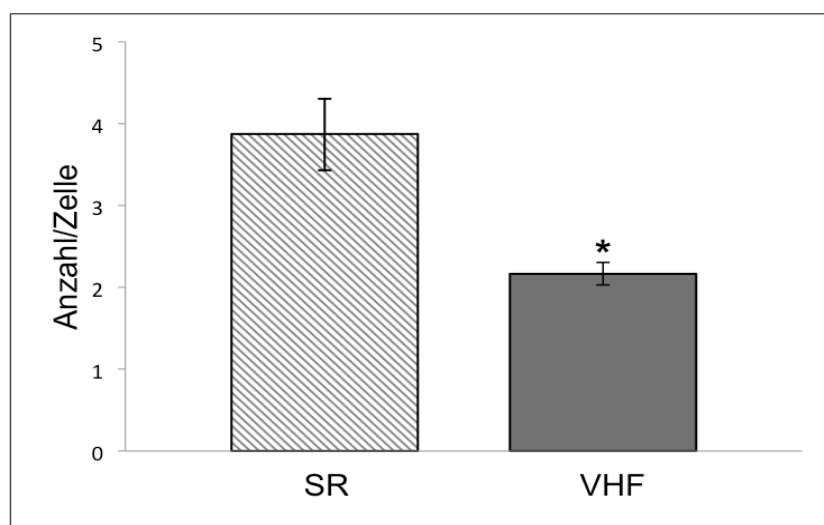


Diagramm 5-10 Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ für SR und VHF

SR Proben weisen $3,87 \pm 0,44$ Tubulinfilamente pro Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ auf, $n = 24$, VHF Proben $2,17 \pm 0,14$, $n = 129$, * $p < 0,001$

5.2 Immunfluoreszenzfärbung Anti-Stathmin und α -Tubulin

Für die Untersuchung des phosphorylierten Anti-Stathmins wurde erneut eine Doppelfluoreszenzfärbung mit α -Tubulin durchgeführt. Aufgrund der räumlichen und funktionellen Nähe von α -Tubulin als ein Bestandteil der Tubulinfilamente und Stathmin als Regulatorprotein der MT wurde die gemeinsame Betrachtung beider Proteine zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges für sinnvoll erachtet. Dieser Zusammenhang ließ sich mikroskopisch jedoch nicht bestätigen. Die nachfolgende Ergebnisdarstellung dieser Färbung bezieht sich deswegen nur auf das Anti-Stathmin (s. Abbildung 5-3), da die Darstellungen und Ergebnisdarlegungen von α -Tubulin bereits in Kapitel 5.1.4 zu finden sind.

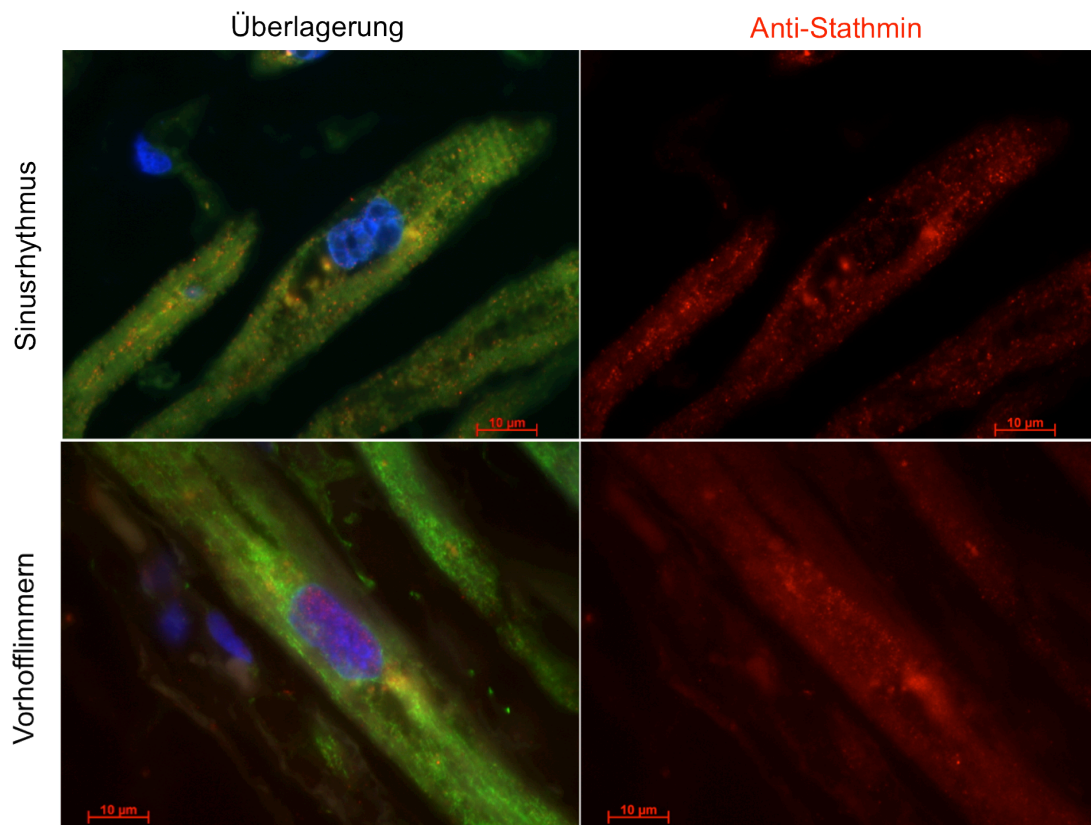


Abbildung 5-3 Darstellung von Anti-Stathmin bei SR und VHF

blau: Ncl., grün: α -Tubulin, rot: Anti-Stathmin, ähnliche Anti-Stathmin Verteilung bei SR und VHF, 1000-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 10 μ m

Mikroskopisch und quantitativ zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen SR und VHF. Deshalb fand in der SR Gruppe keine Differenzierung der Ergebnisse zwischen LA und RA statt. Die Rot-Intensitätsmessungen des perinukleären Raumes im Vergleich zur gesamten Zelle waren für SR

($1,04 \pm 0,013$) und VHF ($1,03 \pm 0,004$) annähernd gleich (Diagramm 5-11). Somit lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen vor ($p = 0,177$).

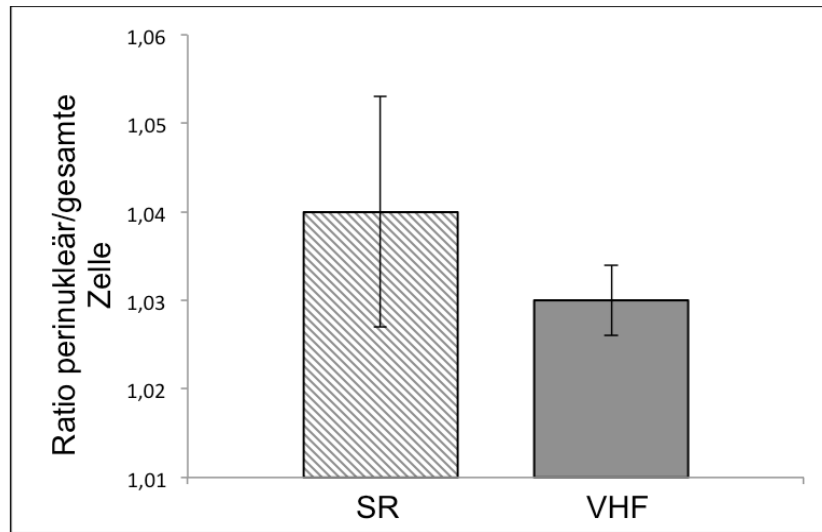


Diagramm 5-11 Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin für SR und VHF

Ratio der Rotintensität perinukleär zur Rot-Intensität der gesamten Zelle, SR: $1,04 \pm 0,013$ mit $n = 24$, VHF: $1,03 \pm 0,004$ mit $n = 129$, $p = 0,177$

5.3 Immunfluoreszenzfärbung Cdk 5 und phospho-GM 130

Die Untersuchungen der Zyklin abhängigen Kinase 5 (vgl. Kapitel 4.5.3), die einen Stimulus zur GA Fragmentierung darstellt, ergaben deutliche Unterschiede zwischen den SR und VHF Proben. Beim SR war die Kinase hauptsächlich ohne bevorzugte Lokalisation in der gesamten Zelle verteilt (s. Abbildung 5-4). Beim VHF hingegen kam die Cdk 5 vor allem an der Zellmembran der Kardiomyozyten vor. Wenn die Cdk 5 aktiv ist, bindet sie an das Phosphoprotein p35/p39. Durch diese Bindung verankert sie sich in der Zellmembran (Sun et al., 2008). Es ist daher anzunehmen, dass es bei VHF im Vergleich zu SR zu einer erhöhten Aktivität der Cdk 5 kam.

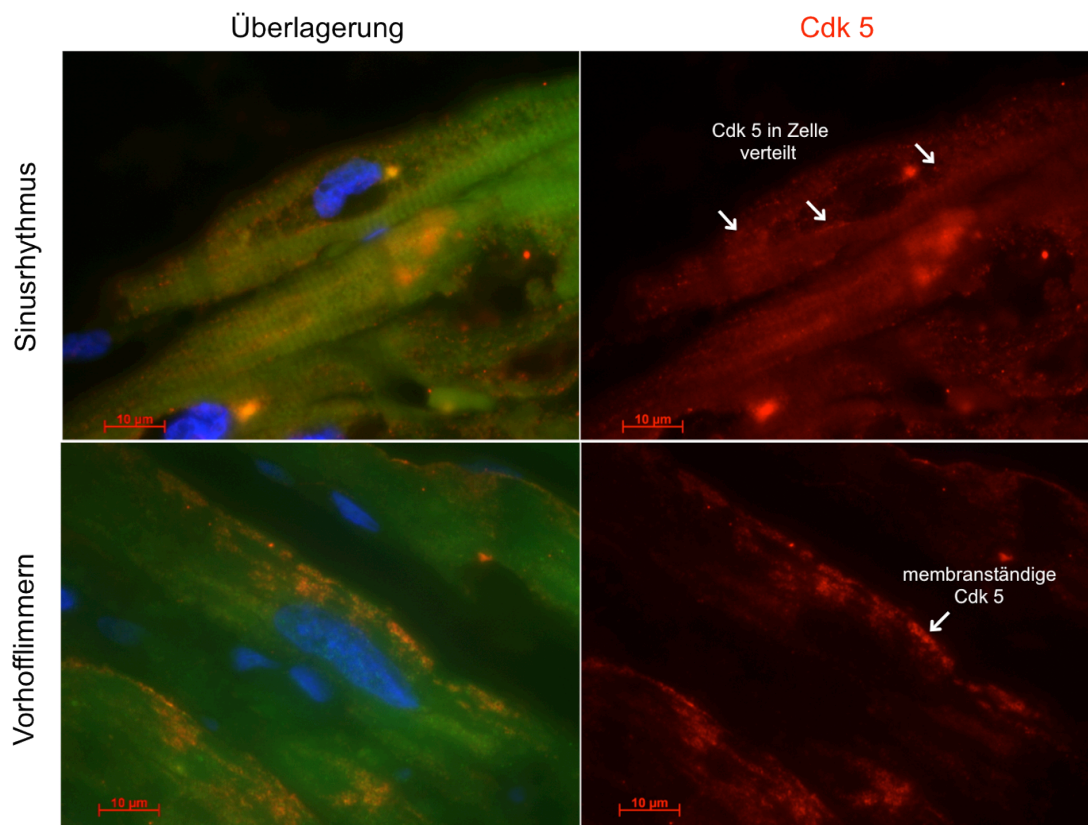


Abbildung 5-4 Darstellung von Cdk 5 und phospho-GM 130 bei SR und VHF

blau Ncl., grün: phospho-GM 130, rot: Cdk 5, Lokalisation der Cdk 5 bei SR in der Zelle verteilt (weißer Pfeil) und bei VHF membranständig (weiße Pfeile), 1000-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 10 µm

Um im Folgenden nur die Gruppen SR und VHF miteinander zu vergleichen, zeigt Diagramm 5-12 zunächst die Unterteilung der SR Gruppe in RA und LA.

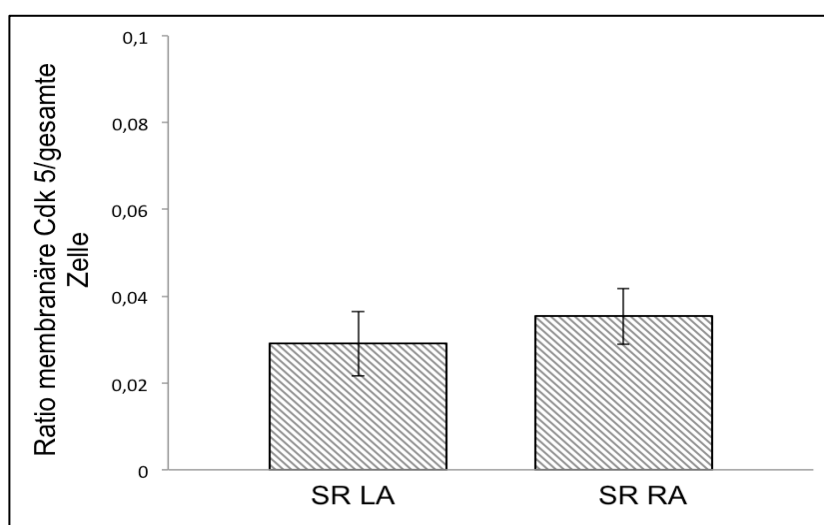


Diagramm 5-12 Verhältnis des Umfangs der membranären Cdk 5 in µm zum Umfang der gesamten Zelle in µm im rechten und linken Atrium für SR

Ratio membranäre Cdk5/gesamte Zelle für SR, LA $0,03 \pm 0,007$, $n = 6$ und RA $0,04 \pm 0,006$, $n = 6$, $p = 0,535$

In der gesunden Kontrollgruppe ergab das Verhältnis des Umfangs der membranären Cdk 5 zu dem Umfang der gesamten Zelle für das LA einen Mittelwert von $0,03 \pm 0,007$ und für das RA einen Mittelwert von $0,04 \pm 0,006$. Es lag mit $p = 0,535$ keine Signifikanz vor.

In Folge dessen war es im Weiteren möglich, die Ergebnisse des LA und RA in der SR Gruppe zu vereinen und nur zwischen den beiden Gruppen SR und VHF zu differenzieren. Bei den untersuchten Schnitten mit SR ergab das Verhältnis des Umfangs der membranären Cdk 5 zum Umfang der gesamten Kardiomyozyten einen Wert von $0,042 \pm 0,006$. Beim VHF zeigten sich dagegen deutlich höhere Werte von $0,095 \pm 0,006$. Die Unterschiede waren mit $p < 0,001$ signifikant.

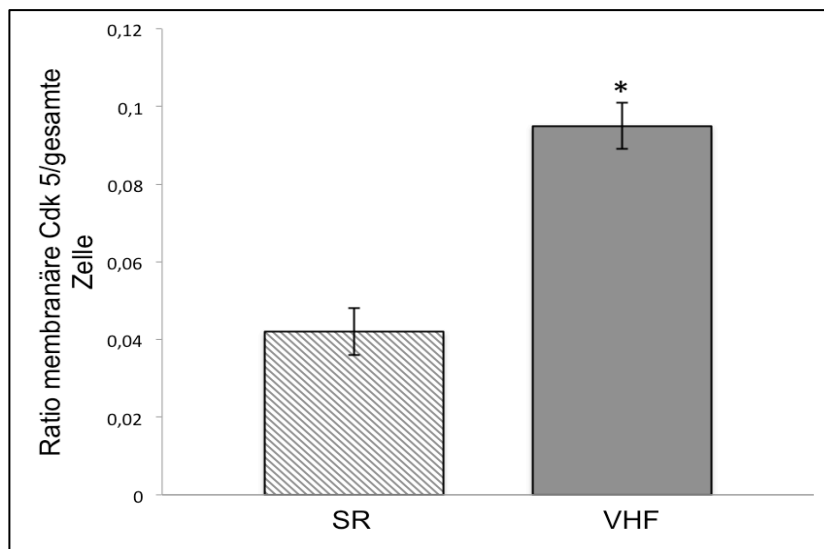


Diagramm 5-13 Verhältnis des Umfangs der membranären Cdk 5 in μm zum Umfang der gesamten Zelle in μm für SR und VHF

Ratio membranäre Cdk5/gesamte Zelle für SR $0,042 \pm 0,006$ mit $n = 24$ und für VHF $0,095 \pm 0,006$ mit $n = 129$, * $p < 0,001$

Bei dieser Doppelfluoreszenzfärbung wurde weiterhin phospho-GM 130, ein Regulatorprotein des Zellzyklus, betrachtet. Es verhielt sich jedoch bei beiden Gruppen wie das unphosphorylierte GM 130 und kam beim SR nahe der Zellkernpole und bei VHF lateral des Ncl vor (s. Kapitel 5.1.1). Deswegen erfolgte dazu keine zusätzliche Auswertung.

5.4 Konfokalmikroskopie

Um die Verteilung der Zellbestandteile innerhalb der Kardiomyozyten dreidimensional abzubilden, erfolgte die Konfokalmikroskopie mit Aufnahme von Z-Stack Bildern (vgl. Kapitel 4.6.2). Dabei bildeten zehn durch eine Zelle gelegte und abfotografierte Schnittebenen ein Bild. Durch die Überlagerung dieser verschiedenen Schnittebenen durch die Zelle kam es zu räumlichen Projektionen. Die Abspeicherung der Z-Stack Bilder erfolgte als LSM-Videodatei, in der das Bild um die eigene Achse rotierte. Mit dem Programm Zen lite black wurden die Z-Stack Bilder in dreidimensionale Bilder konvertiert. Abbildung 5-5 zeigt beispielhaft jeweils ein 3D-Bild einer Herzmuskelzelle für die Gruppen SR und VHF.

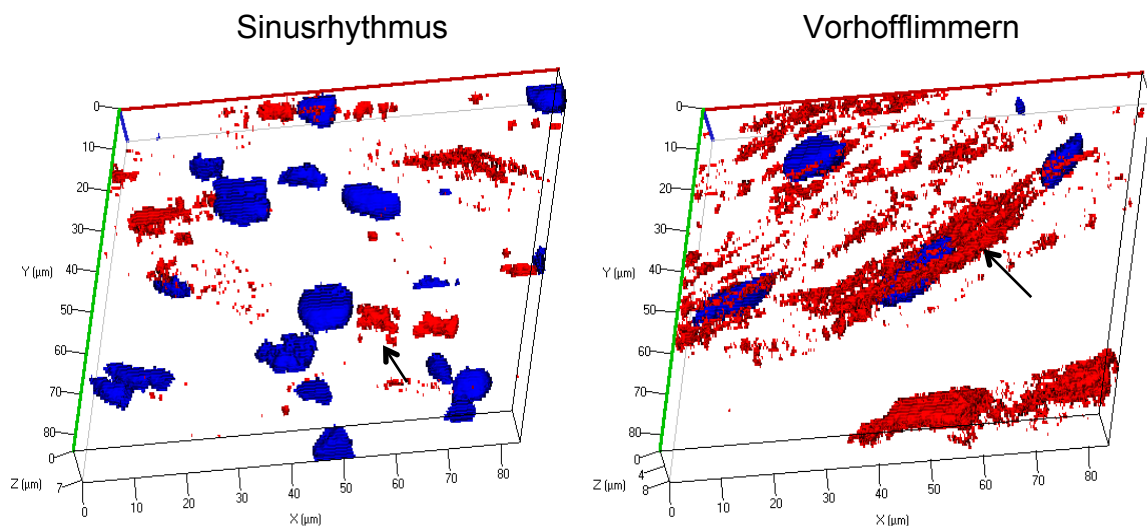


Abbildung 5-5 3D-Darstellung von Z-Stack Bildern für die Gruppen SR und VHF
 konfokalmikroskopische Aufnahmen in Form von Z-Stack-Bildern, links SR, rechts VHF, blau: Ncl, rot: Anti-GM 130, 1000-fache Vergrößerung
 links: in der SR-Zelle zeigt sich der GA (rot) kompakt in einer Ebene um den Ncl (s. Pfeil), rechts: in der VHF-Zelle ist der GA hingegen in mehreren Ebenen um den Ncl. zerstreut und in der kompletten Herzmuskelzelle verteilt (s. Pfeil).

Die Bilder zeigen die räumliche Lage und Anordnung des GA in einer Herzmuskelzelle. Beim SR ließ sich feststellen, dass der GA in einer Ebene mit dem Ncl. lag. Beim VHF hingegen befand sich der GA in mehreren Ebenen um den Zellkern verteilt und war in der gesamten Herzmuskelzelle zerstreut. Somit konnte die Konfokalmikroskopie die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen unterstützen.

5.5 Lineare Korrelationen

5.5.1 Lineare Korrelationen zwischen den histologischen Ergebnissen und den Parametern Ejektionsfraktion sowie Diameter des linken Vorhofs

Wie Tabelle 4-1 in Kapitel 4.1 zeigt, gab es mehrere Kriterien zwischen denen sich die Patienten aus den Gruppen SR und VHF signifikant unterschieden. Die Patienten differenzierten sich nicht nur in der Diagnose SR oder VHF, sondern auch in der Ejektionsfraktion (EF) des Herzens und in dem Diameter des linken Vorhofs. Auch diese beiden Kriterien zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen SR und VHF. Um zu zeigen, dass diese Kriterien aber keinen Einfluss auf die oben dargestellten Ergebnisse haben, wurden lineare Korrelationen zwischen den zwei unabhängigen Variablen (EF in % und Diameter des linken Vorhofs in mm) und den abhängigen Variablen (Intensität Anti-GM 130, Anzahl und Größe der GA Fragmente, Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$, Intensität Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5) erstellt. Da bei den beiden Gruppen SR und VHF nicht von allen Proben Werte für die EF und den Diameter des linken Vorhofs im Vorhinein ermittelt wurden, ist die Probenanzahl n der in diesem Kapitel folgenden linearen Korrelationen geringer als die der Ergebnisse (Kapitel 5.1. bis 5.3).

Zusammenfassend zeigen die linearen Korrelationen, dass trotz der vorhandenen Signifikanz zwischen der EF und dem Diameter des linken Vorhofs in Bezug auf die Gruppen SR und VHF beide Parameter keinen relevanten Einfluss auf die in Kapitel 5.1 bis 5.3 dargelegten Ergebnisse haben. Das verdeutlicht das Bestimmtheitsmaß R^2 , das bei allen Korrelationsfunktionen nahe Null lag (siehe Tabelle 5-1). Ein R^2 von Null spricht laut Tabelle 4-4 in Kapitel 4.7 für keine lineare Abhängigkeit. Des Weiteren gibt der p -Wert an, ob sich R^2 signifikant von Null unterscheidet. Da p fast nie signifikant ist, heißt das, dass das Bestimmtheitsmaß ähnlich bzw. nahe Null ist. Beide Werte p und R^2 sprechen also für keinen linearen Zusammenhang zwischen den Variablen.

Die Ergebnisse mit den signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen SR und VHF scheinen also tatsächlich in der Erkrankung VHF begründet zu liegen, ohne von einem sekundären Effekt wie z. B. einer Vorhofüberdehnung überlagert zu werden. Tabelle 5-1 fasst die Bestimmtheitsmaße R^2 sowie die

Signifikanzwerte p für die Ergebnisreihen der einzelnen Gruppen zusammen. Eine detaillierte Betrachtung der einzelnen linearen Korrelationen ist im Folgenden zu finden.

Tabelle 5-1 Zusammenfassung des Bestimmtheitsmaßes R^2 sowie des p-Wertes (Signifikanz fett gedruckt für $p \leq 0,05$) für die linearen Korrelationen zwischen den histologischen Ergebnissen sowie der EF und dem Diameter des linken Vorhofes

abhängige Variable	unabhängige Variable	Korrelation für SR	Korrelation für VHF	Korrelation für SR+VHF
Intensität Anti-GM130	EF	$R^2=20 \times 10^{-3}$ $p=0,57$	$R^2=0,9 \times 10^{-3}$ $p=0,74$	$R^2=20 \times 10^{-3}$ $p=0,11$
	Diameter li. Vorhof	$R^2=50 \times 10^{-3}$ $p=0,38$	$R^2=0,2 \times 10^{-3}$ $p=0,87$	$R^2=10 \times 10^{-3}$ $p=0,16$
Anzahl GA Fragmente	EF	$R^2=0,1 \times 10^{-3}$ $p=0,96$	$R^2=20 \times 10^{-3}$ $p=0,13$	$R^2=0,4 \times 10^{-3}$ $p=0,82$
	Diameter li. Vorhof	$R^2=80 \times 10^{-3}$ $p=0,25$	$R^2=5 \times 10^{-3}$ $p=0,42$	$R^2=0,3 \times 10^{-3}$ $p=0,84$
Größe GA Fragmente	EF	$R^2=0,9 \times 10^{-3}$ $p=0,90$	$R^2=4 \times 10^{-3}$ $p=0,48$	$R^2=9 \times 10^{-3}$ $p=0,24$
	Diameter li. Vorhof	$R^2=50 \times 10^{-3}$ $p=0,38$	$R^2=50 \times 10^{-3}$ $p=0,01$	$R^2=0,08 \times 10^{-3}$ $p=0,91$
Anzahl Tubulinfilamente	EF	$R^2=0,2 \times 10^{-3}$ $p=0,96$	$R^2=0,1 \times 10^{-3}$ $p=0,90$	$R^2=2 \times 10^{-3}$ $p=0,58$
	Diameter li. Vorhof	$R^2=5 \times 10^{-3}$ $p=0,77$	$R^2=10 \times 10^{-3}$ $p=0,19$	$R^2=20 \times 10^{-3}$ $p=0,08$
Intensität Anti-Stathmin	EF	$R^2=10 \times 10^{-3}$ $p=0,68$	$R^2=4 \times 10^{-3}$ $p=0,50$	$R^2=4 \times 10^{-3}$ $p=0,44$
	Diameter li. Vorhof	$R^2=30 \times 10^{-3}$ $p=0,49$	$R^2=6 \times 10^{-3}$ $p=0,37$	$R^2=6 \times 10^{-3}$ $p=0,35$
Umfang Cdk 5	EF	$R^2=3 \times 10^{-3}$ $p=0,83$	$R^2=0,03 \times 10^{-3}$ $p=0,95$	$R^2=2 \times 10^{-3}$ $p=0,53$
	Diameter li. Vorhof	$R^2=15 \times 10^{-3}$ $p=0,62$	$R^2=2 \times 10^{-3}$ $p=0,64$	$R^2=8 \times 10^{-3}$ $p=0,29$

a) Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130

Zunächst erfolgte die lineare Korrelation zwischen der unabhängigen Variablen EF in % und der abhängigen Variablen Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 für beide Gruppen SR und VHF getrennt betrachtet (Diagramm 5-14).

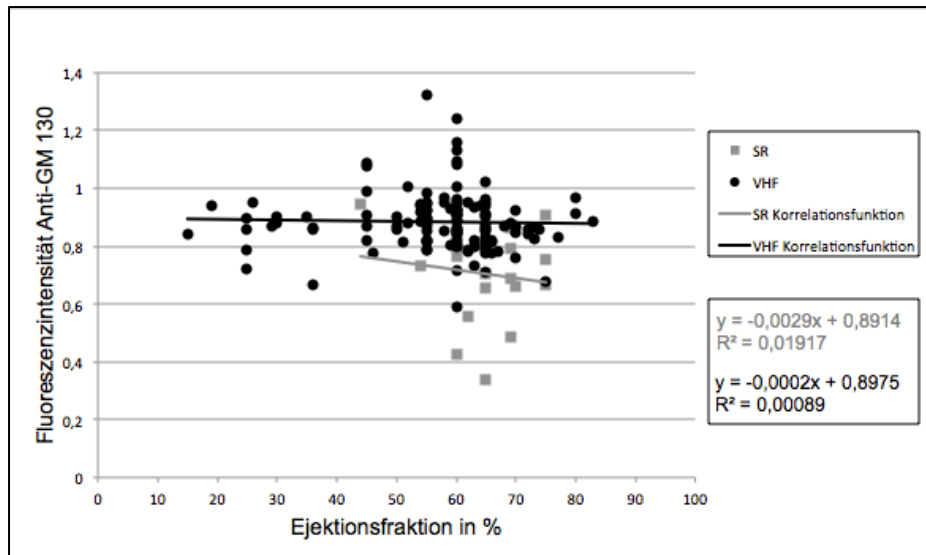


Diagramm 5-14 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben ($n = 19$) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben ($n = 125$) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag

Das Bestimmtheitsmaß R^2 für die lineare Korrelation der SR Gruppe (s. Diagramm 5-14, grau) betrug rund 20×10^{-3} und war somit nahe Null. Für die VHF Gruppe (s. Diagramm 5-14, schwarz) lag R^2 bei $0,9 \times 10^{-3}$. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass nahezu keine lineare Abhängigkeit zwischen der EF und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 für beide Gruppen bestand (vgl. Tabelle 4-4). Zur genaueren Überprüfung, ob evtl. doch ein funktioneller Zusammenhang zwischen der EF und der Fluoreszenzintensität vorliegt, wurden zusätzlich die linearen Korrelationen über die Variablen beider Gruppen zusammen betrachtet, da so die Spannweite der Daten zunimmt (s. Diagramm 5-15). Das Bestimmtheitsmaß R^2 betrug in diesem Fall rund 20×10^{-3} und war also ebenfalls nahe Null. Da somit sowohl für beide Gruppen getrennt, als auch für SR und VHF zusammen betrachtet, kein funktioneller Zusammenhang bestand, lässt sich schließen, dass die EF mit großer Sicherheit keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 hat.

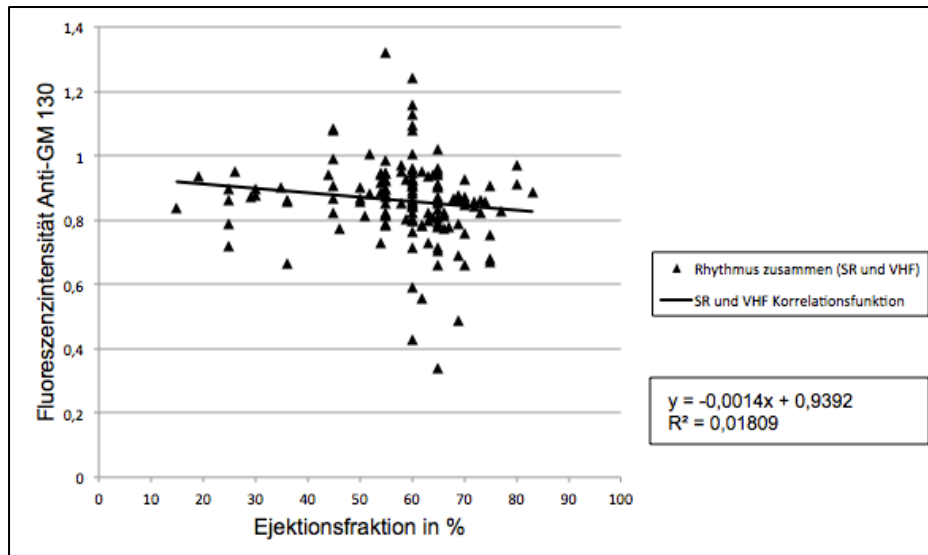


Diagramm 5-15 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130

Punktwolke für beide Gruppen SR (n = 19) und VHF (n = 125) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

In Diagramm 5-16 ist der lineare Zusammenhang zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 dargestellt. Die lineare Korrelation über die Messwerte der SR Gruppe resultierte in einem R^2 von 50×10^{-3} und über die Messwerte der VHF Gruppe in $0,2 \times 10^{-3}$. Somit lag eine sehr geringe lineare Korrelation zwischen den beiden Variablen Diameter linker Vorhof und Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 vor. Eine gemeinsame Betrachtung beider Gruppen ergab ein R^2 von 10×10^{-3} (s. Diagramm 5-17). Die gemeinsame, zusätzlich zur gruppenspezifischen Betrachtung erfolgte Analyse verdeutlicht somit, dass kein relevanter funktioneller Zusammenhang zwischen beiden Variablen vorherrschte. Der Diameter des linken Vorhofs als Parameter war also für eine Erklärung der Ergebnisse der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 ungeeignet.

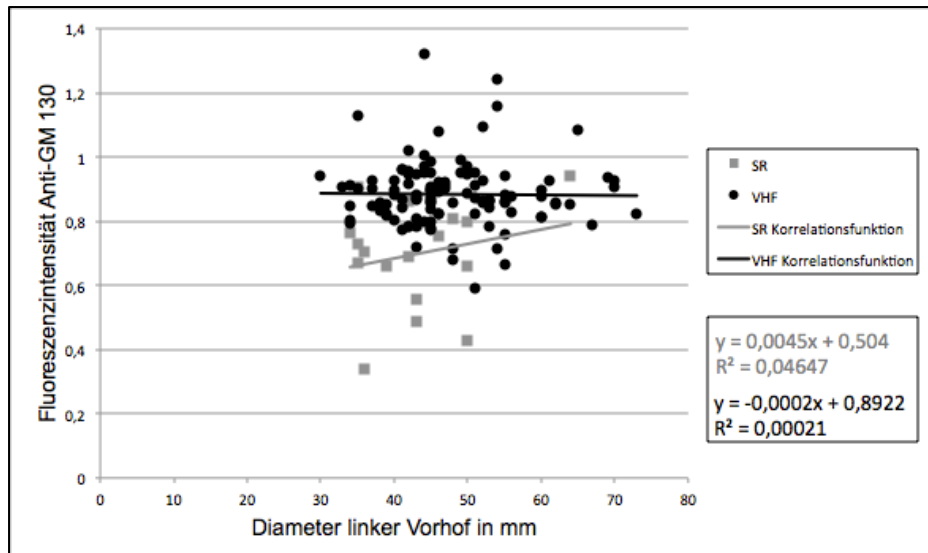


Diagramm 5-16 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben ($n = 19$) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben ($n = 125$) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

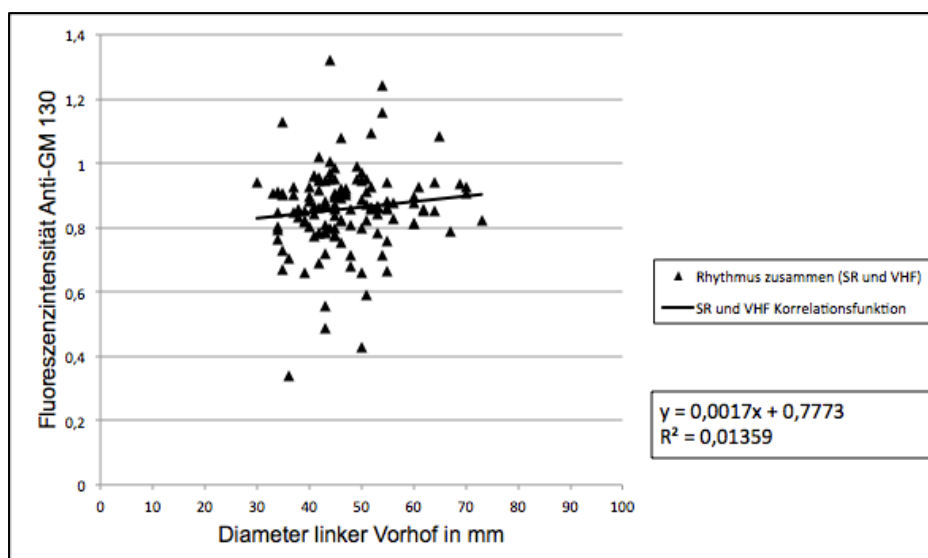


Diagramm 5-17 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130

Punktwolke für beide Gruppen SR ($n = 19$) und VHF ($n = 125$) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

b) Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente

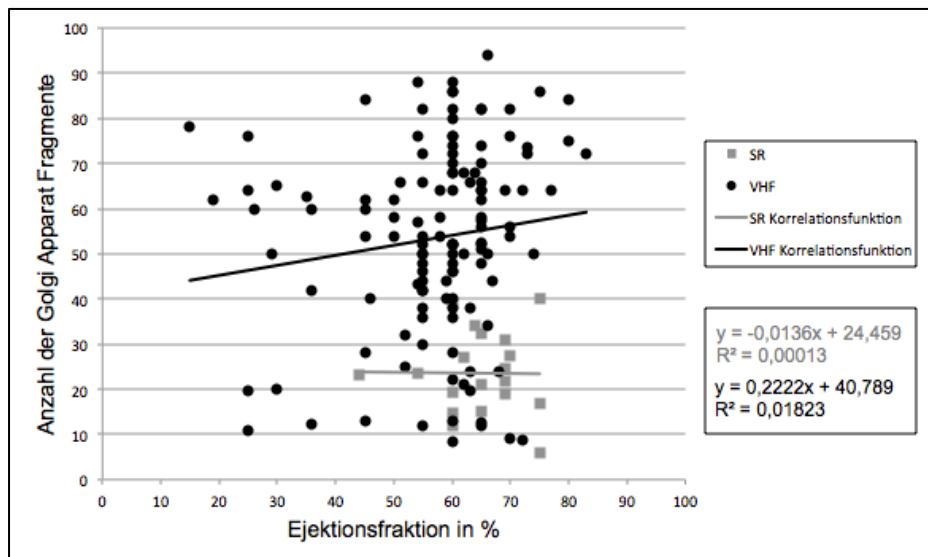


Diagramm 5-18 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben (n = 19) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben (n = 125) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

Diagramm 5-18 zeigt die lineare Abhängigkeit zwischen der EF in % und der Anzahl der GA Fragmente jeweils für die Gruppen SR und VHF. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei rund $0,1 \times 10^{-3}$ für die Daten der SR Gruppe und etwa 20×10^{-3} für die Daten der VHF Gruppe. Die gemeinsame Betrachtung der Gruppen ergab ein Bestimmtheitsmaß R^2 von rund $0,4 \times 10^{-3}$ und war nahezu Null (s. Diagramm 5-19). Es herrschte somit fast kein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, sodass die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bezüglich der Anzahl der GA Fragmente höchstwahrscheinlich unabhängig von der EF entstanden sind (vgl. Kapitel 5.1.2).

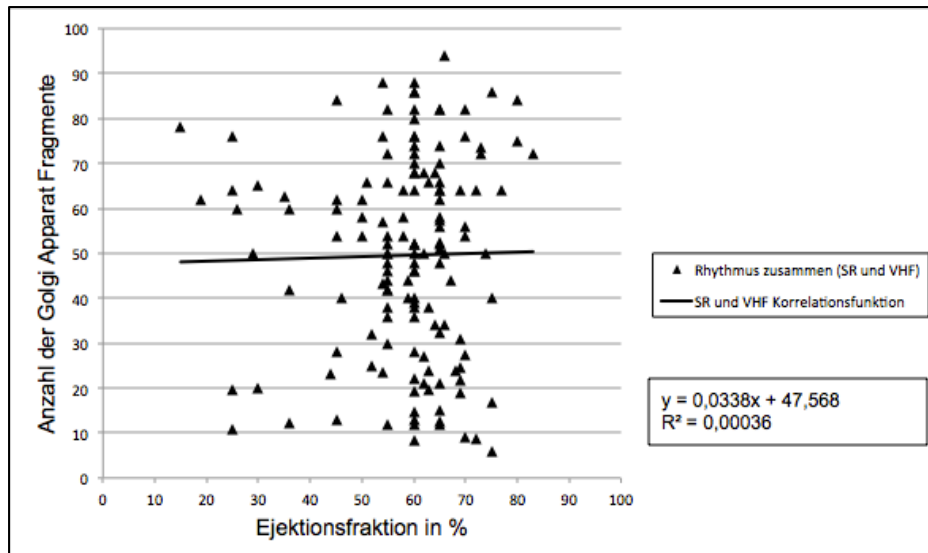


Diagramm 5-19 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente

Punktwolke für beide Gruppen SR (n = 19) und VHF (n = 125) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

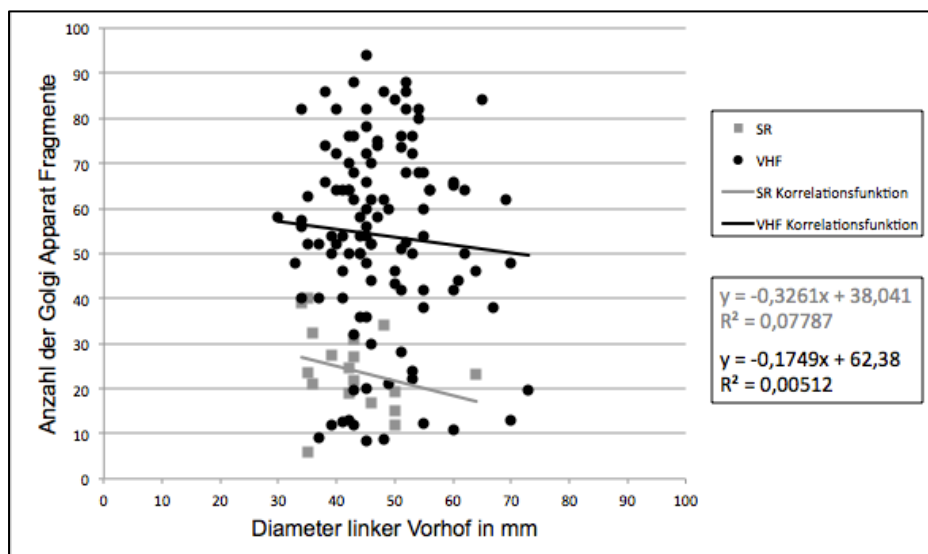


Diagramm 5-20 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben (n = 19) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben (n = 125) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

Diagramm 5-20 stellt die Beziehung zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Anzahl der GA Fragmente für jeweils beide Gruppen grafisch dar. Auch hier bestand nur eine sehr geringe lineare Abhängigkeit zwischen den beiden Variablen mit einem R^2 von 80×10^{-3} für die SR Gruppe und 5×10^{-3} für die VHF Gruppe. Auch bei der gemeinsamen Betrachtung (s. Diagramm 5-21)

ergab R^2 einen Wert nahe Null, nämlich rund $0,3 \times 10^{-3}$. Da also sowohl für beide Gruppen getrennt, als auch für SR und VHF zusammen betrachtet, kein funktioneller Zusammenhang bestand, lässt sich schließen, dass der Diameter des linken Vorhofs mit großer Sicherheit keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Anzahl der GA Fragmente hat (vgl. Kapitel 5.1.2).

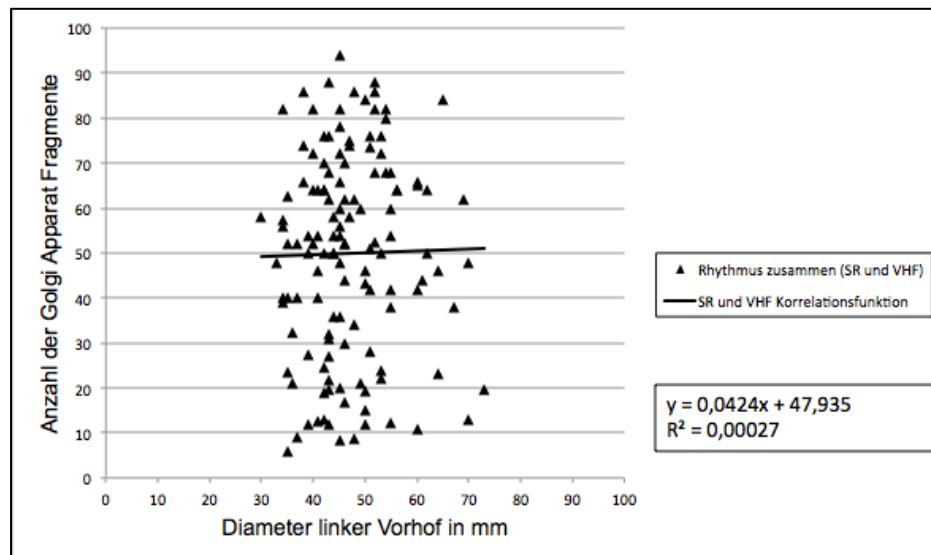


Diagramm 5-21 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente

Punktwolke für beide Gruppen SR ($n = 19$) und VHF ($n = 125$) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

c) Größe der Golgi-Apparat Fragmente

Diagramm 5-22 gibt die lineare Korrelation zwischen der EF in % und der Größe der GA Fragmente bezogen auf die definierte Fläche grafisch wieder. R^2 betrug bei der linearen Korrelation der SR Gruppe etwa $0,9 \times 10^{-3}$ und bei der VHF Gruppe rund 4×10^{-3} . Wie bereits bei den anderen Korrelationen herrschte auch hier nur ein sehr geringer linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen. Diese Aussage bestätigte sich auch bei der gemeinsamen Darstellung der Gruppen in Diagramm 5-23. Hier lag das Bestimmtheitsmaß bei 9×10^{-3} . Das verdeutlicht, dass nahezu kein funktioneller Zusammenhang zwischen der EF und der Größe der GA Fragmente vorzufinden war.

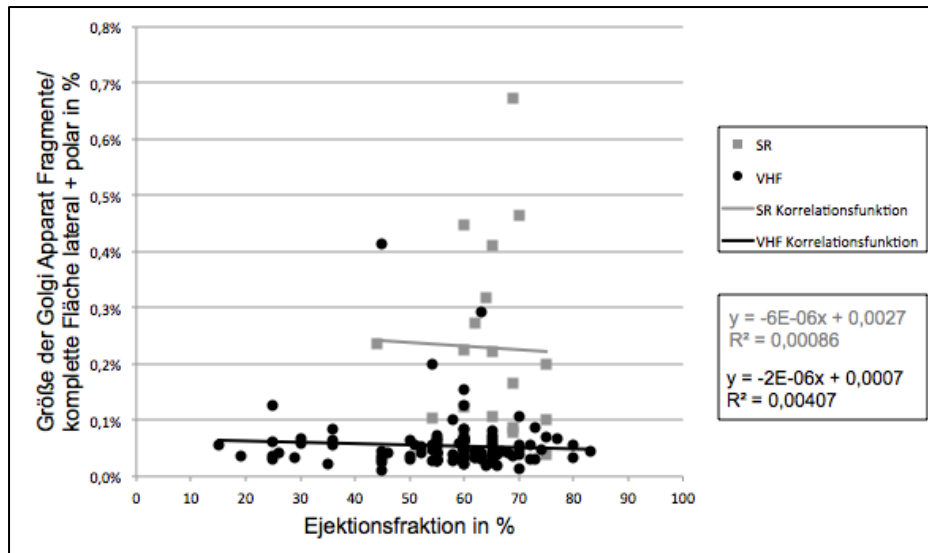


Diagramm 5-22 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Ratio Größe der Golgi-Apparat Fragmente/komplette definierte Fläche in %

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben (n = 19) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben (n = 125) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

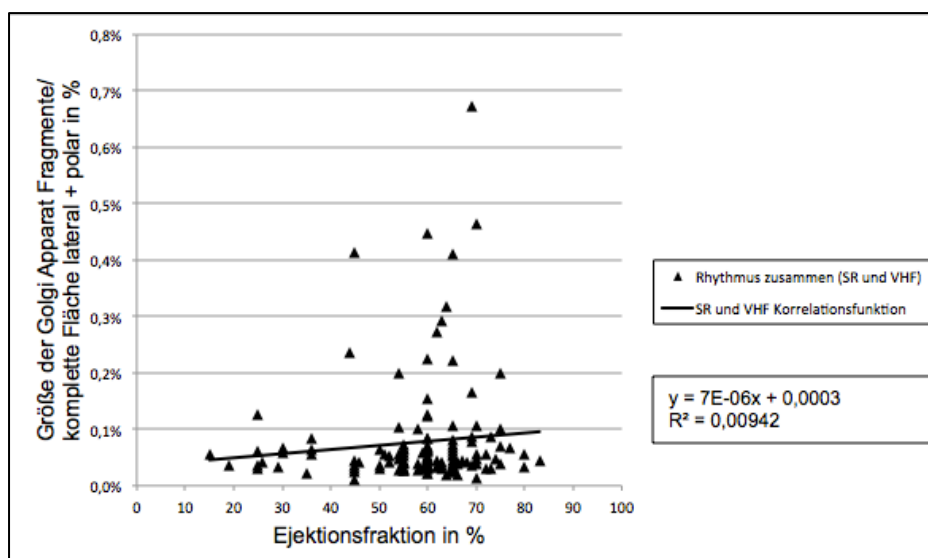


Diagramm 5-23 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Ratio Größe der Golgi-Apparat Fragmente/komplette definierte Fläche in %

Punktwolke für beide Gruppen SR (n = 19) und VHF (n = 125) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

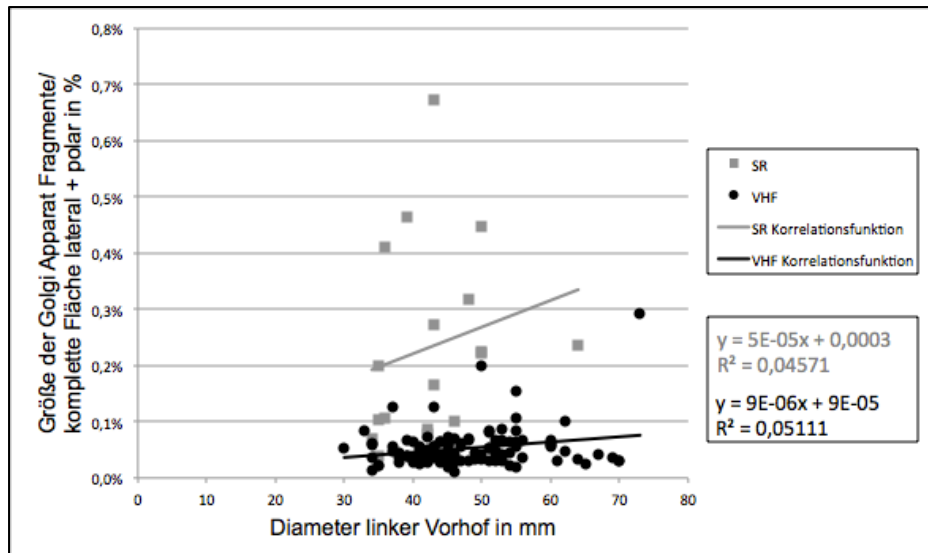


Diagramm 5-24 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Größe der Golgi-Apparat Fragmente

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben (n = 19) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben (n = 125) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

Zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Größe der GA Fragmente gab es laut Diagramm 5-24 erneut nahezu keine lineare Korrelation, da R^2 bei der SR Gruppe ca. 50×10^{-3} und bei der VHF Gruppe ebenfalls rund 50×10^{-3} ergab. Auch die vereinte Darstellung von SR und VHF zusammen zeigte einen extrem niedriges Bestimmtheitsmaß von nahe Null ($R^2 = 0,08 \times 10^{-3}$, s. Diagramm 5-25). Da sowohl für jeweils beide Gruppen getrennt, als auch für SR und VHF zusammen betrachtet, kein funktioneller Zusammenhang bestand, lässt sich schließen, dass der Diameter des linken Vorhofs mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Größe der GA Fragmente hat (vgl. Kapitel 5.1.3).

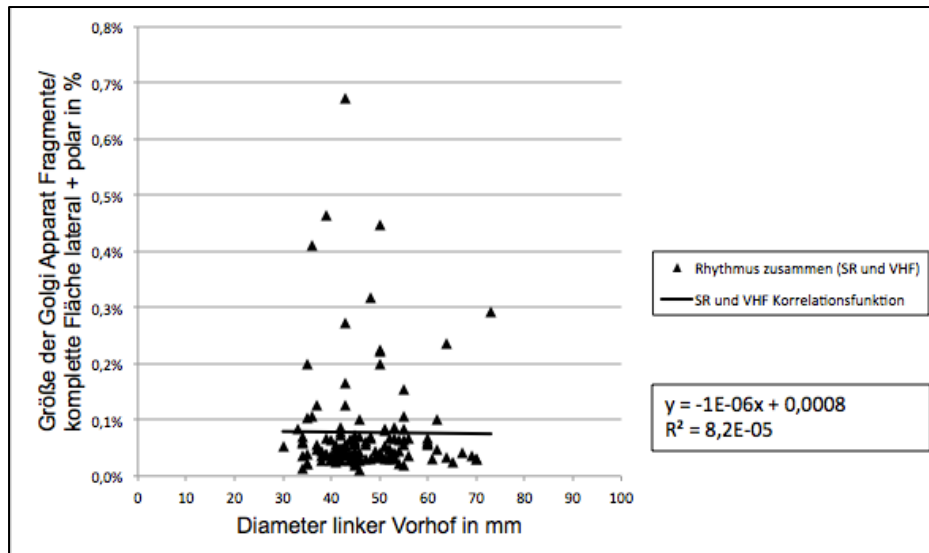


Diagramm 5-25 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Größe der Golgi-Apparat Fragmente

Punktwolke für beide Gruppen SR (n = 19) und VHF (n = 125) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

d) Anzahl der Tubulinfilamente

Sowohl bei der linearen Korrelation zwischen den zwei Variablen EF in % und Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$, als auch zwischen den Parametern Diameter des linken Vorhofs in mm und Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ herrschte kein linearer Zusammenhang.

Die Abhängigkeit der EF, die im Diagramm 5-26 dargestellt ist, zeigt ein Bestimmtheitsmaß von rund $0,2 \times 10^{-3}$ für die SR Gruppe und etwa $0,1 \times 10^{-3}$ für die VHF Gruppe. Auch die gemeinsame lineare Korrelation für die Gruppen SR und VHF mit einem R^2 von 2×10^{-3} sprach für keinen bzw. einen mangelnden funktionellen Zusammenhang zwischen den abhängigen und unabhängigen Variablen (s. Diagramm 5-27).

Für die Abhängigkeit des Diameters des linken Vorhofs und der Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ ergab R^2 über die Messwerte der SR Gruppe einen Wert von ca. 5×10^{-3} und der VHF Gruppe rund 10×10^{-3} . (s. Diagramm 5-28). Somit lagen alle genannten Korrelationskoeffizienten nahe Null und es bestand nahezu kein linearer Zusammenhang. Diese Aussage bestätigte auch Diagramm 5-29. Die Untersuchung für SR und VHF vereint betrachtet, brachte ein Bestimmtheitsmaß von 20×10^{-3} hervor, was ebenfalls für eine mangelnde Korrelation beider Variablen spricht.

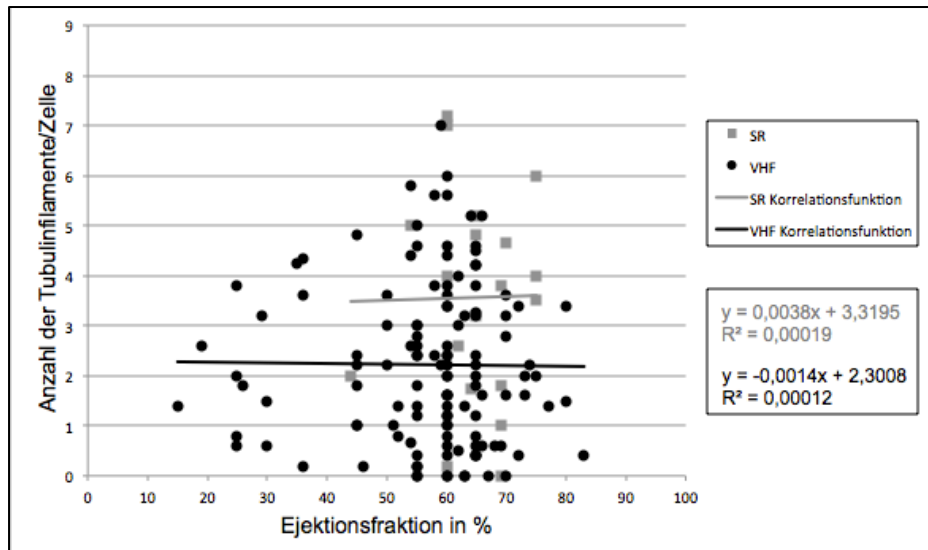


Diagramm 5-26 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben ($n = 19$) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben ($n = 125$) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

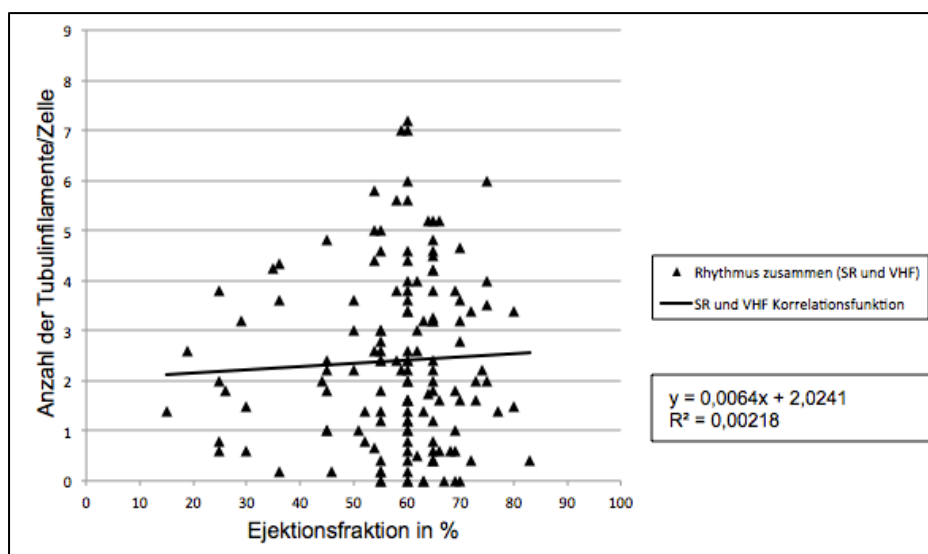


Diagramm 5-27 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$

Punktwolke für beide Gruppen SR ($n = 19$) und VHF ($n = 125$) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

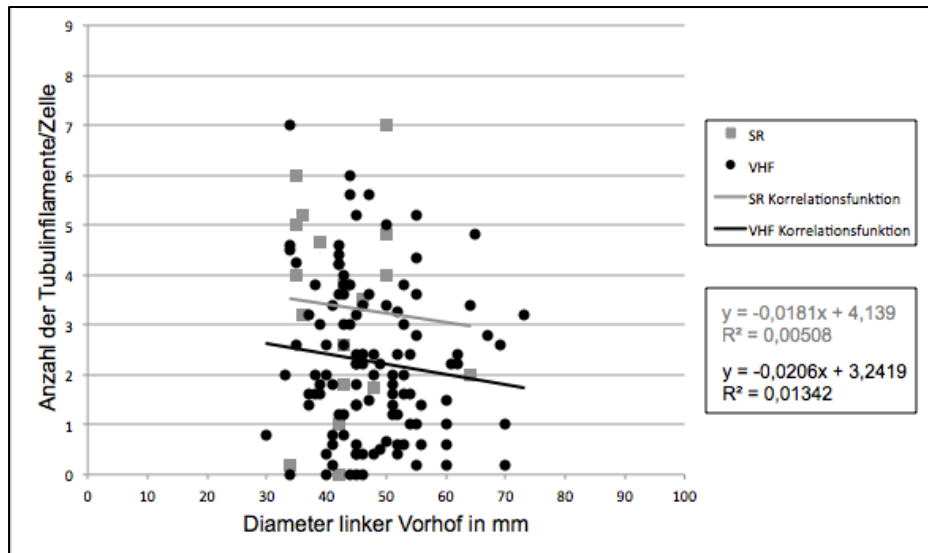


Diagramm 5-28 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm

Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben ($n = 19$) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben ($n = 125$) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

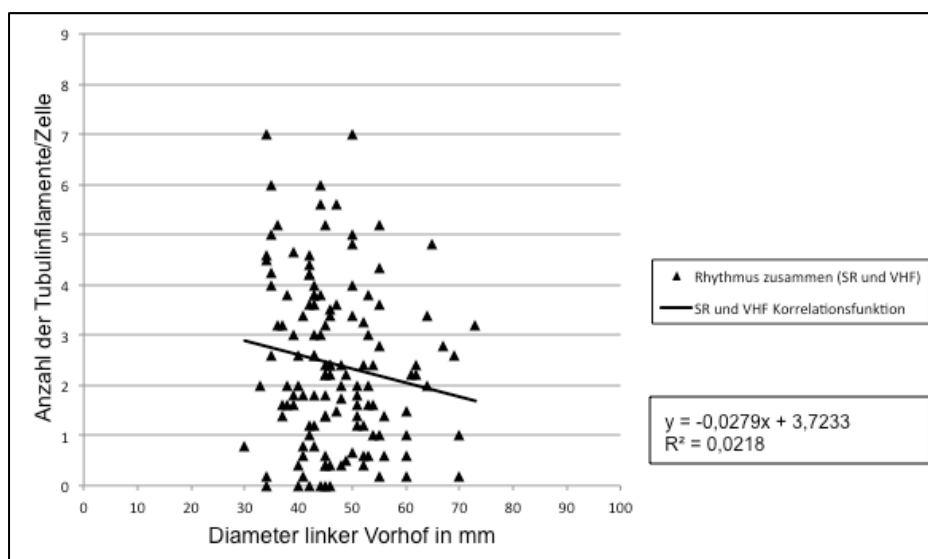


Diagramm 5-29 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm

Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$

Punktwolke für beide Gruppen SR ($n = 19$) und VHF ($n = 125$) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

e) Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin

Diagramm 5-30 zeigt, dass auch hier sehr geringe lineare Abhängigkeiten zwischen den Variablen EF in % und Fluoreszenzintensität des phosphorylierten Anti-Stathmins vorlagen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 bezüglich der Abhängigkeit von der EF betrug für die SR Gruppe etwa 10×10^{-3} und für die VHF Gruppe ca. 4×10^{-3} .

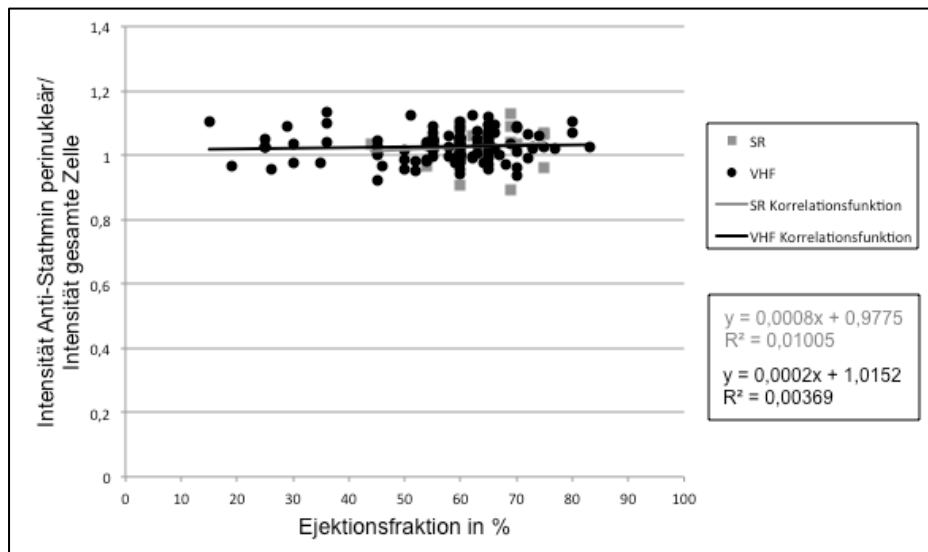


Diagramm 5-30 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben ($n = 19$) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben ($n = 125$) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

Wenn man beide Gruppen zusammen linear korreliert, ergibt sich ebenfalls ein sehr geringes R^2 von 4×10^{-3} (s. Diagramm 5-31). Da sowohl für beide Gruppen getrennt, als auch für SR und VHF zusammen betrachtet, kein bzw. ein sehr geringer funktioneller Zusammenhang bestand, lässt sich daraus schließen, dass die EF mit großer Sicherheit keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Anti-Stathmin Fluoreszenzintensität hat (vgl. Kapitel 5.2).

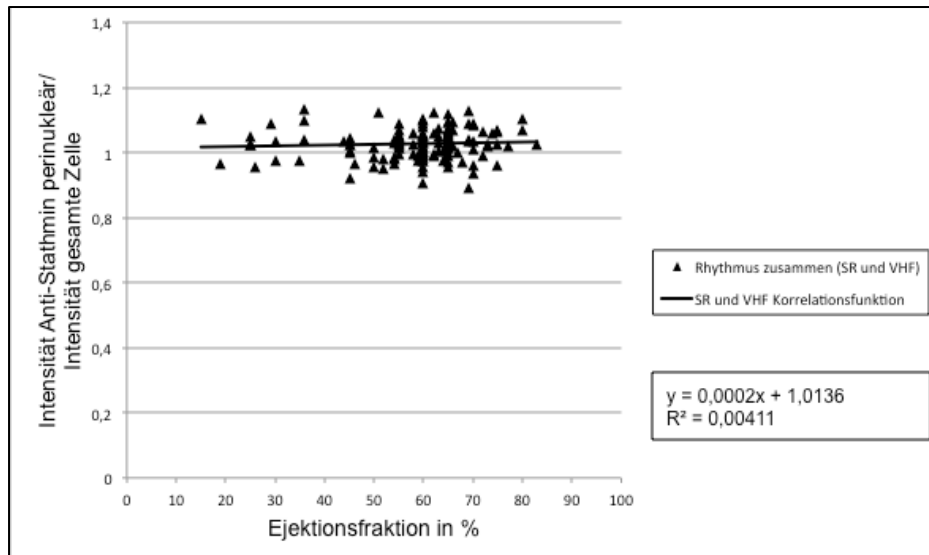


Diagramm 5-31 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin

Punktwolke für beide Gruppen SR (n = 19) und VHF (n = 125) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

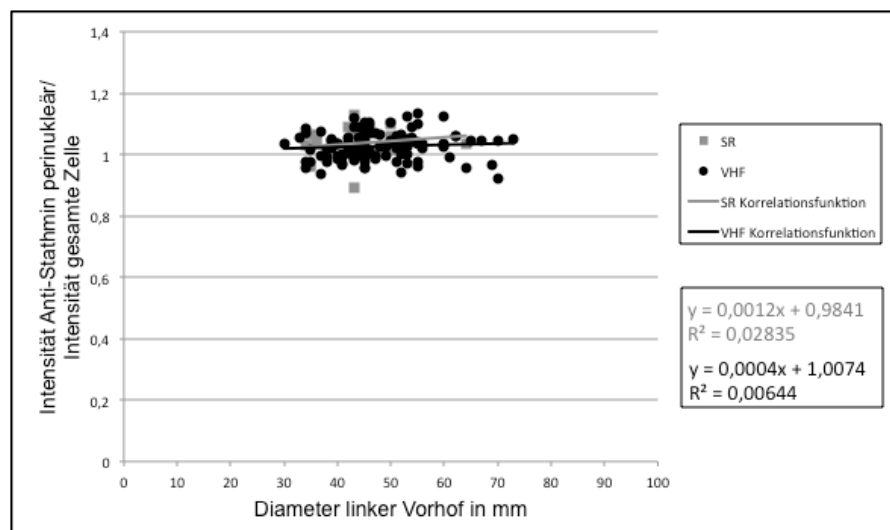


Diagramm 5-32 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben (n = 19) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben (n = 125) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

Die lineare Korrelation bezüglich der Abhängigkeit des Diameters des linken Vorhofs resultierte in einem R^2 von rund 30×10^{-3} für die SR Gruppe und von etwa 6×10^{-3} für die VHF Gruppe (s. Diagramm 5-32). Bei der Auswertung beider Gruppen zusammen ließ sich ein Bestimmtheitsmaß von 6×10^{-3} ermitteln (s. Diagramm 5-33). Das bedeutet, dass die abhängige Variable Diameter linker

Vorhof nicht geeignet ist, um einen funktionellen Zusammenhang zwischen ihr und den Ergebnissen der Anti-Stathmin Auswertung herzustellen (vgl. Kapitel 5.2).

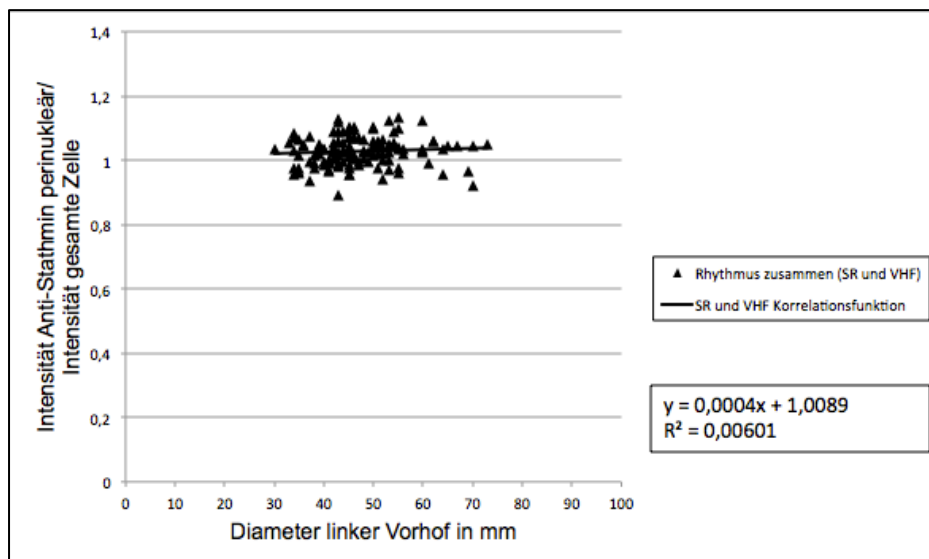


Diagramm 5-33 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin

Punktwolke für beide Gruppen SR ($n = 19$) und VHF ($n = 125$) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

f) Zellumfang Cdk 5

Zunächst erfolgt die Auswertung des Zusammenhanges zwischen der EF in % und der Cdk 5 (s. Diagramm 5-34). Für die Daten der SR Gruppe ergab R^2 rund 3×10^{-3} und für die VHF Gruppe etwa $0,02 \times 10^{-3}$. Es zeigte sich somit nahezu kein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, da beide Werte nahe Null lagen. Dass kein funktioneller Zusammenhang zwischen der EF und den Ergebnissen der Cdk 5 vorlag, verdeutlicht auch Diagramm 5-35. Die lineare Korrelation der gemeinsamen Auswertung beider Gruppen ermittelte ein nahe Null liegendes R^2 von 2×10^{-3} . Somit lässt sich auch bei größerer Datenspannweite eine Relation zwischen beiden Variablen ausschließen.

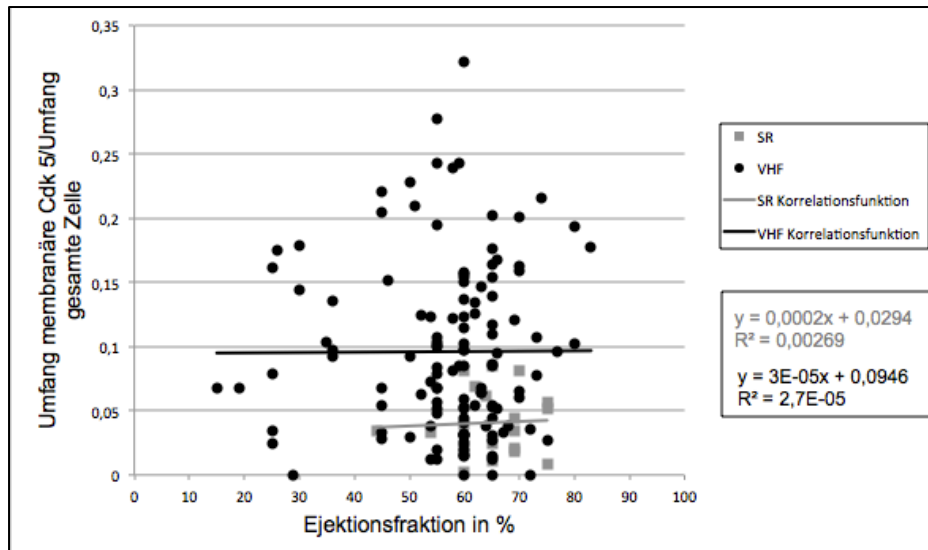


Diagramm 5-34 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und Cdk 5
 grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben (n = 19) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben (n = 125) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

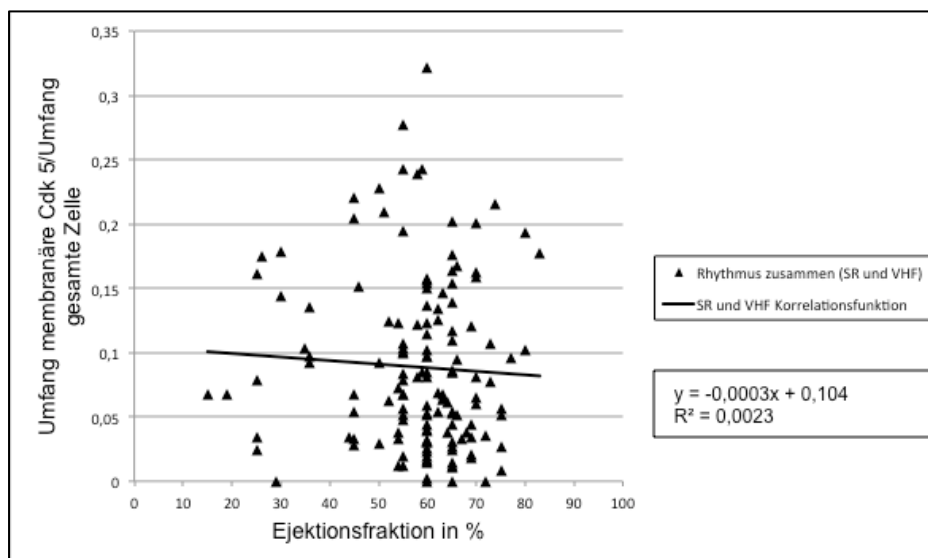


Diagramm 5-35 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und Cdk 5
 Punktwolke für beide Gruppen SR (n = 19) und VHF (n = 125) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

Schließlich stellt Diagramm 5-36 noch die Abhängigkeit zwischen den Parametern Diameter linker Vorhof in mm und Cdk 5 für jeweils beide Gruppen dar. Auch hier herrschte keine relevante lineare Abhängigkeit, denn das Bestimmtheitsmaß für die Gerade durch die Datenpunkte der SR Gruppe lag bei ca. 15×10^{-3} und für die VHF Gruppe bei rund 2×10^{-3} . Zur genaueren Überprüfung, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Diameter und der Cdk 5 vorliegt, wurde zusätzlich

für beide Gruppen zusammen eine lineare Korrelation betrachtet (s. Diagramm 5-37). Das Bestimmtheitsmaß betrug in diesem Fall rund 8×10^{-3} und war ebenfalls nahe Null. Da sowohl für beide Gruppen getrennt, als auch für SR und VHF zusammen betrachtet, kein funktioneller Zusammenhang bestand, lässt sich schließen, dass der Diameter des linken Vorhofs mit großer Sicherheit keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Cdk 5 hat (vgl. Kapitel 5.3).

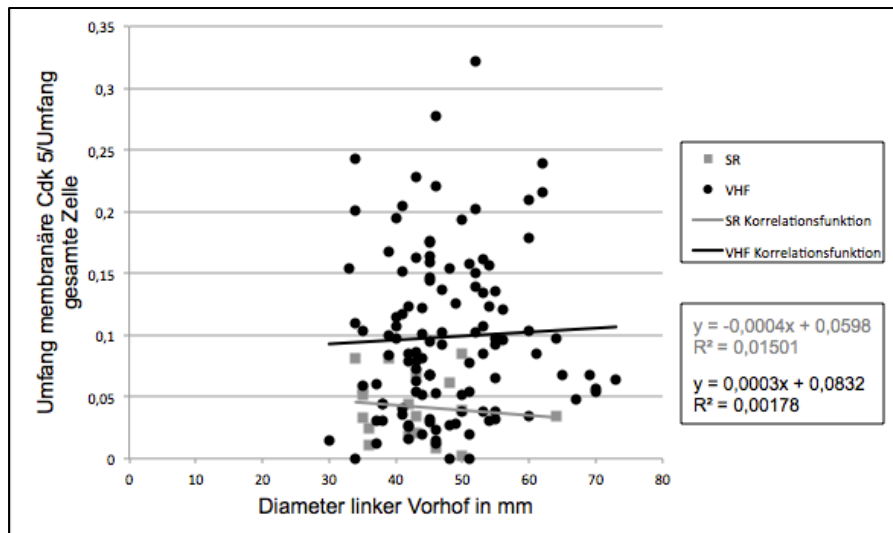


Diagramm 5-36 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und Cdk 5

grau: Punktwolke der einzelnen SR Proben ($n = 19$) mit linearer Funktion, schwarz: Punktwolke der einzelnen VHF Proben ($n = 125$) mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 bei beiden Gruppen nahe Null lag.

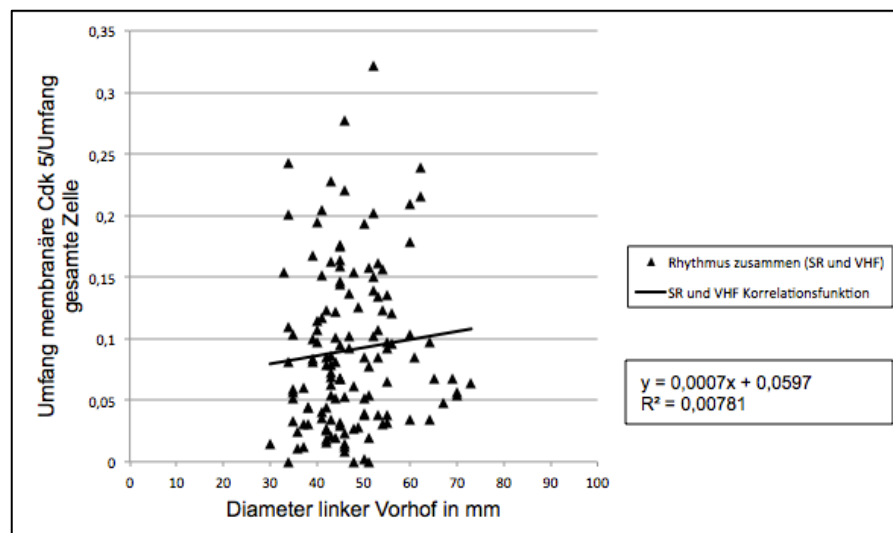


Diagramm 5-37 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und Cdk 5

Punktwolke für beide Gruppen SR ($n = 19$) und VHF ($n = 125$) zusammen mit linearer Funktion, keine lineare Korrelation zwischen den Variablen, da R^2 nahe Null lag

5.5.2 Lineare Korrelationen zwischen den histologischen Ergebnissen untereinander

Die Parameter, die in vorliegender Arbeit untersucht wurden, scheinen sich untereinander zu bedingen und voneinander abhängig zu sein (siehe Diskussion, Kapitel 6). Um diese Zusammenhänge quantitativ nachzuweisen und rechnerisch zu untermauern, wurden zur Vervollständigung der Ergebnisse lineare Korrelationen zwischen den einzelnen histologischen Parametern errechnet.

Zunächst fasst Tabelle 5-2 die Ergebnisse aus den Kapiteln 5.1 bis 5.3 für die gesunde Gruppe SR und die an VHF erkrankte Gruppe zusammen. Des Weiteren ergeben sich aus der Tabelle die Dynamik der Werte zwischen SR und VHF sowie ob es sich bei den Werten um signifikante Unterschiede handelt.

Tabelle 5-2 Zusammenfassung der Ergebnisse mit Mittelwerten, Standardfehler, Dynamik und p-Wert (Signifikanz fett gedruckt)

Parameter	SR	VHF	VHF vs. SR	p-Wert
Anzahl n	24	129		
Intensität Anti-GM 130, MW \pm SEM	0,73 \pm 0,03	0,88 \pm 0,009	↑	<0,01
Anzahl GA Fragmente, MW \pm SEM	23,4 \pm 1,88	52,5 \pm 1,9	↑	<0,001
Größe GA Fragmente(%), MW \pm SEM	0,2 \pm 0,033	0,05 \pm 0,004	↓	<0,01
Anzahl Tubulinfilamente, MW \pm SEM	3,87 \pm 0,44	2,17 \pm 0,14	↓	<0,001
Intensität Anti-Stathmin, MW \pm SEM	1,04 \pm 0,013	1,03 \pm 0,004	↔	0,177
Umfang Cdk 5, MW \pm SEM	0,042 \pm 0,006	0,095 \pm 0,006	↑	<0,001

Tabelle 5-3 zeigt zusammenfassend die linearen Korrelationsfunktionen der histologischen Ergebnisse mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 sowie dem p-Wert. Entgegen der Erwartungen, lag R^2 nur in einigen Fällen zwischen 0,1 und 0,2. Das spricht laut Tabelle 4-4 für einen sehr geringen Zusammenhang zwischen den einzelnen Ergebnissen. Auch der p-Wert ist nur teilweise signifikant. Das bedeutet, dass sich R^2 nur zum Teil signifikant von Null unterscheidet und eine lineare Abhängigkeit aufweist. Es ist somit lediglich eine Tendenz zu erkennen. Da die Korrelationen in diesem Kapitel nur der Vollständigkeit halber ermittelt wurden und keine durchgängig signifikanten bzw. relevanten Abhängigkeiten

ergaben, sind die Diagramme für eine detaillierte Betrachtung in den Anlagen (s. Kapitel 12) zu finden.

Tabelle 5-3 Zusammenfassung der Korrelationsfunktionen, des Bestimmtheitsmaßes R^2 sowie des p-Wertes (Signifikanz fett gedruckt für $p \leq 0,05$) für die linearen Korrelationen der histologischen Ergebnisse

abhängige Variable	unabhängige Variable	Korrelation für SR	Korrelation für VHF	Korrelation für SR+VHF
Intensität Anti-GM130	Anzahl Tubulinfilamente	$y=1,1x+3,1$ $R^2=7 \times 10^{-3}$ $p=0,71$	$y=3,1x-0,6$ $R^2=39 \times 10^{-3}$ $p=0,02$	$y=-0,3x+2,7$ $R^2=0,3 \times 10^{-3}$ $p=0,83$
	Intensität Anti-Stathmin	$y=0,1x+1$ $R^2=32 \times 10^{-3}$ $p=0,41$	$y=-0,03x+1,1$ $R^2=5 \times 10^{-3}$ $p=0,41$	$y=-0,02x+1,1$ $R^2=3 \times 10^{-3}$ $p=0,53$
	Umfang Cdk 5	$y=-0,1x+0,7$ $R^2=0,6 \times 10^{-3}$ $p=0,91$	$y=-0,1x+0,9$ $R^2=3 \times 10^{-3}$ $p=0,54$	$y=0,2x+0,8$ $R^2=9 \times 10^{-3}$ $p=0,23$
Anzahl GA Fragmente	Größe GA Fragmente	$y=-5 \times 10^{-6}$ $R^2=1 \times 10^{-3}$ $p=0,89$	$y=-5 \times 10^{-6}$ $R^2=49 \times 10^{-3}$ $p=0,01$	$y=-1 \times 10^{-5}$ $R^2=131 \times 10^{-3}$ $p=0,004 \times 10^{-3}$
	Anzahl Tubulinfilamente	$y=-0,1x+5,5$ $R^2=88 \times 10^{-3}$ $p=0,16$	$y=0,02x+1,3$ $R^2=54 \times 10^{-3}$ $p=0,008$	$y=-0,001x+2,5$ $R^2=0,3 \times 10^{-3}$ $p=0,84$
	Intensität Anti-Stathmin	$y=0,001x+1,0$ $R^2=40 \times 10^{-3}$ $p=0,35$	$y=0,0003x+1,0$ $R^2=26 \times 10^{-3}$ $p=0,07$	$y=0,0002x+1,0$ $R^2=7 \times 10^{-3}$ $p=0,31$
	Umfang Cdk 5	$y=61,3x+20,8$ $R^2=36 \times 10^{-3}$ $p=0,38$	$y=101,3x+42,9$ $R^2=100 \times 10^{-3}$ $p=0,3 \times 10^{-3}$	$y=139x+36$ $R^2=160 \times 10^{-3}$ $p=0,003 \times 10^{-3}$
Größe GA Fragmente	Anzahl Tubulinfilamente	$y=-32,8x+3,9$ $R^2=0,6 \times 10^{-3}$ $p=0,91$	$y=-285,5x+2,3$ $R^2=7 \times 10^{-3}$ $p=0,35$	$y=310,8x+2,2$ $R^2=25 \times 10^{-3}$ $p=0,05$
	Intensität Anti-Stathmin	$y=-14,9x+1,1$ $R^2=138 \times 10^{-3}$ $p=0,07$	$y=3,9x+1,0$ $R^2=2 \times 10^{-3}$ $p=0,65$	$y=-2,7x+1,0$ $R^2=3 \times 10^{-3}$ $p=0,53$
	Umfang Cdk 5	$y=-0,004x$ $R^2=5 \times 10^{-3}$ $p=0,73$	$y=-0,001x$ $R^2=20 \times 10^{-3}$ $p=0,11$	$y=-0,003x$ $R^2=57 \times 10^{-3}$ $p=0,003$
Anzahl Tubulinfilamente	Intensität Anti-Stathmin	$y=4,5x-0,8$ $R^2=18 \times 10^{-3}$ $p=0,53$	$y=-3,1x+5,3$ $R^2=7 \times 10^{-3}$ $p=0,34$	$y=0,4x+2$ $R^2=0,12 \times 10^{-3}$ $p=0,89$
	Umfang Cdk 5	$y=7,5x+3,6$ $R^2=10 \times 10^{-3}$ $p=0,65$	$y=0,3x+2,1$ $R^2=0,1 \times 10^{-3}$ $p=0,89$	$y=-2,3x+2,6$ $R^2=7 \times 10^{-3}$ $p=0,31$
Intensität Anti-Stathmin	Umfang Cdk 5	$y=0,5x+1,0$ $R^2=55 \times 10^{-3}$ $P=0,27$	$y=0,06x+1$ $R^2=8 \times 10^{-3}$ $p=0,32$	$y=0,04x+1$ $R^2=3 \times 10^{-3}$ $p=0,47$

6 Diskussion

6.1 Intrazelluläre Veränderungen bei VHF

VHF führt auf Grund des arrhythmischen Schlagens des Herzens zu veränderten Zug- und Dehnungskräften in den Vorhöfen (Dhein, 2011; Lewalter, 2011). Das atriale Herzgewebe versucht, sich an diese neuen Kräfte und Belastungen anzupassen. Dadurch kommt es zu Umbauprozessen und Chronifizierungen in Form von Remodelingprozessen, die auf unterschiedlichen Ebenen vonstattengehen (s. Kapitel 1.2). Es entstehen elektrische, mechanische, metabolische und strukturelle Anpassungsvorgänge (Allessie et al., 2002; Dhein, 2011; Laky et al., 2011). Die veränderten Zug- und Dehnungskräfte beeinflussen u. a. die Kardiomyozyten strukturell auf intrazellulärer Ebene. Das geschieht, indem sie morphologisch auf die Zellorganellen und das Zytoskelett sowie funktionell auf Kinasen und Proteine einwirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese strukturellen intrazellulären Veränderungen genauer zu untersuchen, indem humane SR Vorhofmyokardproben mit VHF Myokardproben durch Immunfluoreszenzfärbungen und zum Teil auch Konfokalmikroskopie verglichen wurden. Dabei zeigten sich bei den VHF Proben Fragmentierungen und Neuansordnungen des GA, zerstörte Mikrotubuli (MT), Neuverteilungen der Cdk 5, aber auch gleiche Anordnungen des phosphorylierten Anti-Stathmins und phospho-GM. Das bedeutet, dass VHF zu einer Neu- und Umstrukturierung sowie zu einer veränderten Biophysikologie innerhalb der Herzmuskelzelle führt. Diese Mechanismen scheinen also für die Pathophysiologie des VHF von Bedeutung zu sein, da die beobachteten intrazellulären Veränderungen mit zur Chronifizierung der Herzrhythmusstörung beitragen können.

6.2 Morphologie und Anordnung des GA bei VHF sowie Ursachen und Folgen seiner Fragmentierung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen ergaben, dass es bei VHF zu einer Fragmentierung des GA kommt. Das zeigte sich in den signifikant kleineren und vermehrten Bestandteilen des GA im Vergleich zu den SR Proben (s. Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). Durch die Zerstörung des GA veränderte sich

ebenfalls seine Lage. Sowohl die Fluoreszenz- als auch die Konfokalmikroskopie zeigten, dass der GA bei der Kontrollgruppe vorrangig kompakt und intakt an den Zellkernpolen erschien. Bei der VHF Gruppe zeigten sich die GA Fragmente hingegen mehr lateral des Ncl. und innerhalb der gesamten Zelle verstreut (s. Kapitel 5.1.1 und 5.4). Auf Grund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass bei VHF die Zerstörung des GA eine Umverteilung bzw. veränderte Lage des GA und seiner Bestandteile innerhalb der Kardiomyozyten bewirkt.

Eine Golgi Fragmentierung während der Mitose ist physiologisch. Doch die hier beobachtete pathologische GA Zerstörung erfolgt irregulär und unabhängig von mitotischen Prozessen. Daraus lässt sich schließen, dass die Funktion des GA wahrscheinlich beeinträchtigt ist. Folgen können eine gestörte Protein- und Lipidsynthese sowie beeinträchtigte posttranslationale Proteinmodifikationen (Glykosylierungen, Sulfatierungen, Phosphorylierungen, proteolytische Abspaltungen) sein. Ebenso können unterbrochene sekretorische Transportwege zwischen ER, Golgi Komplex, endosomal-lysosomalen Systemen und Plasmamembran resultieren (Sun et al., 2008). Des Weiteren stimuliert einerseits Zellstress eine GA Fragmentierung, andererseits begünstigt auch eine GA Zerstörung Zellstress, was wiederum apoptotische Prozesse triggert und so zu Zelldegenerationen sowie Zelltod führt (Hicks und Machamer, 2005). Das hat Auswirkungen auf die gesamte zelluläre Homöostase, was in Erkrankungen münden kann (Bexiga und Simpson, 2013). Es ist also möglich, dass die GA Fragmentierung sowohl eine Folge als auch eine Ursache des VHF ist, da ein gestörtes GA Gleichgewicht Krankheiten begünstigt und aufrechterhält.

Es ist bekannt, dass zahlreiche Genmutationen zu Golgi Komplex Beeinträchtigungen bzw. Fragmentierungen führen und als Konsequenz diverse neurodegenerative Erkrankungen entstehen können. Bei der Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit des ZNS kommt es z. B. durch ein mutiertes Proteolipid Protein 1 (Bestandteil von Myelin) zu einer Fehlfaltung und Akkumulation von Chaperonen im ER und GA, was den Transport zwischen beiden Zellorganellen einschränkt und zu einer GA Fragmentierung führt. Der Mb. Parkinson ist mit einer Akkumulation von α -Synuclein in präsynaptischen Neuronen, veränderten Spiegeln von *Ras-related proteins* (Oncogene) und einer Transportblockade zwischen ER und GA assoziiert. Des Weiteren tritt ebenfalls eine GA Fragmentierung auf, was die Ansammlung von α -Synuclein begünstigt

und die Erkrankung somit aufrechterhält. Defekte in der Proteinglykosylierung führen zu muskulären Dysfunktionen und Multisystemerkrankungen. Bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne fehlt beispielsweise das Protein Dystrophin. Das führt zu einer abnormalen Organisation des GA, was als Krankheitsfolge, aber auch als Grundlage der Aufrechterhaltung der Erkrankung verstanden werden kann (Bexiga und Simpson, 2013). Die Pathophysiologie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) geht ebenfalls mit Mutationen in mehr als 20 Genen einher. In den betroffenen Motoneuronen von ALS Patienten kommt es zu fragmentierten oder atrophierten GA mit folglichem Zelltod der Motoneurone und Axone (Haase und Rabouille, 2015). Auch beim Mb. Alzheimer treten bereits in frühen Stadien GA Fragmentierungen auf, was mutierte Tauproteine in den Neuronen ansteigen lässt und somit den Erkrankungsprogress beschleunigt. Außerdem ist die Größe des GA im fortgeschrittenen Krankheitsstadium kleiner, was auf einen verminderten neuronalen Metabolismus hindeutet (Hu et al., 2007). Der Zusammenhang zwischen genetisch bedingten neurologischen Erkrankungen und GA Zerstörungen gilt also als gesichert. Es ist vorstellbar, dass auch bei genetisch bedingtem VHF Genmutationen eine Rolle spielen, die den GA Abbau fördern. Dieser Ansatz erfordert weiterführende Untersuchungen, v. a. von Gewebeproben von alleinigem VHF, damit die Ergebnisse möglichst unabhängig von anderen Begleiterkrankungen sind.

Der Golgi Komplex fungiert in neuronalen Zellen als funktioneller Calciumspeicher und hält die zelluläre Calciumhomöostase mit aufrecht (Fan et al., 2008). Eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern ist wichtig für das Neuronenwachstum sowie für die synaptische Entwicklung. Der GA nimmt das Calcium zum einen über eine Calciumpumpe vom Typ der SERCA und zum anderen über sekretorische Calcium-ATPasen auf (Rojas et al., 2000). Die Stabilität des GA ist also abhängig von einem physiologischen Calciumgleichgewicht. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu neuronalen Dysfunktionen bis hin zum Zelltod kommen. Viele neurodegenerative Erkrankungen werden durch Störungen in Calciumkanälen bzw. Calciumpumpen verursacht (Fan et al., 2008). Beim Mb. Alzheimer spielt eine Dysregulation der Calciumsignalwege eine entscheidende Rolle. Die gestörte Homöostase kann zu einer vermehrten Bildung von Amyloid-Beta Plaques und einer Hyperphosphorylierung von Tauproteinen führen, was den Krankheitsprozess von

Mb. Alzheimer beschleunigt (Fan et al., 2008). Bei der ALS ist es möglich, dass sich Antikörper in Form von IgG gegen L-Typ Calciumkanäle bilden, die zu einem Zelltod der Motoneurone in den Vorderhornzellen des Rückenmarks führen. Der Antikörpertiter korreliert direkt mit dem Krankheitsverlauf. Eine Untersuchung von kultivierten Motoneuronen *in vitro* ergab, dass die zytotoxisch wirkenden Antikörper das intrazelluläre Calcium im GA und ER steigern, sodass die Zellorganellen anschwellen, der GA fragmentiert und die Zellen absterben (Demestre et al., 2006). Auch bei der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington spielt eine gestörte Calciumregulation im GA eine wichtige Rolle in der Pathogenese, da der im GA vorkommende Calciumkanal für die regulären neuronalen Funktionen mitverantwortlich zu sein scheint (Fan et al., 2008). In Bezug auf VHF ist bekannt, dass es zu Störungen der Ionenkanäle in der Zellmembran der Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards kommt, was die Entstehung und Aufrechterhaltung von Mikro-Reentrykreisläufen begünstigt (s. Kapitel 1.2.2). Entweder steigt der nach intrazellulär gerichtete Kaliumfluss (durch den *inward rectifier* Kaliumkanal I_{K1}) an oder der einwärts gerichtete L-Typ Calciumfluss fällt ab. Beide Prozesse führen zu einer verfrühten Repolarisation und verkürzen somit das atriale AP sowie die atriale Refraktärzeit, was die Entstehung von Reentrykreisläufen fördert. Durch die Fibrosebildung in den Vorhöfen, die im Rahmen des strukturellen Remodelings bei VHF entsteht, wird die Erregungsausbreitung gestört bzw. blockiert, was zusätzlich Reentrykreisläufe begünstigt (Andrade et al., 2014). Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine gestörte Calciumhomöostase, wie sie neben VHF auch bei Mb. Alzheimer, ALS und bei der Chorea Huntington vorkommt, die in dieser Arbeit beobachtete GA Fragmentierung erklären kann. Bezogen auf das Calciumgleichgewicht kann man die Zerstörung des GA also als mögliche Folge des VHF betrachten.

Fan und Mitarbeiter (2008) beleuchteten neben Genmutationen und einem veränderten Calciumgleichgewicht einen Zusammenhang zwischen dem Hormon Östrogen und neurodegenerativen Erkrankungen. Östrogen scheint einen protektiven Effekt auf Krankheiten wie Mb. Alzheimer und Mb. Parkinson zu haben, indem es die Neurone vor oxidativem Stress und Amyloid-Beta Ablagerungen schützt sowie den GA stabilisiert. An VHF erkranken mehr Männer als Frauen (Andrade et al., 2014), sodass es sein kann, dass der Östrogenmangel bei Männern eine GA Fragmentierung und somit VHF begünstigt. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit lässt sich ein Zusammenhang zwischen Östrogenmangel und VHF nur vermuten, den es in weiterführenden geschlechtsgetrennten Untersuchungen zwischen SR und VHF zu überprüfen gilt.

Yoshida und Mitarbeiter (1999) ermittelten in hepatozellulären Carcinomzellen eine Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert und einer GA Fragmentierung. Bestand über einen längeren Zeitraum von 16 Stunden ein niedriger intrazellulärer pH-Wert von 6,6, so kam es zu einer reversiblen GA Fragmentierung, ohne jedoch das ER oder die MT zu beeinflussen. Bei VHF kann es durch den oxidativen Zellstress bzw. wegen der Hypoxie auch zu einer pH-Senkung in den Herzmuskelzellen kommen, was eine Fragmentierung des GA erklären könnte.

Der GA spielt eine wichtige Rolle im Transport und in der Synthese von Lipiden. Intrazelluläre Ansammlungen von Cholesterol verändern die Funktion sowie Struktur des ER und der Zisternen des GA. In welcher Form diese Veränderungen genau von statten gehen, ist noch unklar (Fan et al., 2008). Als Risikofaktoren für VHF gelten neben dem Geschlecht auch Faktoren, die mit einem erhöhten Cholesterolspiegel assoziiert sind. Dazu zählen u. a. Übergewicht, Hypertension, valvuläre Herzerkrankungen, koronare Herzkrankheit, perikardiale Fettablagerungen, Diabetes mellitus usw. (Andrade et al., 2014). Es ist also möglich, dass die in dieser Arbeit beobachteten GA Veränderungen unter anderem auch durch eine intrazelluläre Akkumulation von Cholesterol beeinflusst sind.

Dhein und Mitarbeiter (2014) untersuchten den Zusammenhang zwischen zyklisch mechanischer Dehnung und deren Auswirkungen auf die zelluläre Organisation innerhalb von Kardiomyozyten neonataler Ratten. Die Herzmuskelzellen wurden für 24 Stunden gestretcht und anschließend wurde die Reorganisation der Zellorganellen und des Zytoskeletts beurteilt. Stretch verursachte eine Elongation der Kardiomyozyten mit Organisation der Tubulinfilamente parallel zur Zellachse. Der GA richtete sich auf einer Seite des Ncl. in Richtung eines Zellpoles aus, wohingegen er vor dem Stretch um den gesamten Ncl. verteilt vorkam. Die zyklisch mechanische Dehnung verursachte also eine veränderte intrazelluläre Organisation und Orientierung u. a. des GA und der Tubulinfilamente. Es ist durchaus denkbar, dass auch VHF eine stretchähnliche Wirkung auf die humanen Kardiomyozyten hat. Allerdings erfolgt die Dehnung bei VHF nicht zyklisch und auch nicht auf 24 Stunden begrenzt.

Wenn jedoch solche Folgen bereits nach einem Tag vorzufinden sind, dann sind die Folgen von chronischem, langanhaltendem und unkoordiniertem VHF wahrscheinlich ausgeprägter. Wegen der oft VHF begleitenden Mitralklappenfehler kommen statische Dehnungen hinzu, die auf die Herzmuskelzellen wirken. Die größeren Durchmesser des LA in der VHF Gruppe zeigen (vgl. Tabelle 4-1), dass Erkrankungen der Mitralklappe zusätzlich zu VHF die Vorhöfe dehnen und ähnlich statischen Stretches auf das Myokard wirken. Eventuell führt VHF zu Beginn der Erkrankung zu einer Umorganisation des GA. Im Verlauf fragmentiert der GA dann möglicherweise als Folge der chronischen und langanhaltenden veränderten Zug- und Dehnungskräfte. Des Weiteren ist bekannt, dass Stretch Ionenkanäle aktiviert (Dhein et al., 2014). In Untersuchungen kam es zu einem Einstrom von Natrium und Calcium, was ein AP in den Herzmuskelzellen auslöste. Dieses irreguläre bzw. frühzeitige durch Stretch ausgelöste AP beeinflusste die reguläre Depolarisation, Repolarisation und somit auch die Refraktärzeit der atrialen Zellen. Das begünstigte Arrhythmien. In Tierversuchen führte dies zu ventrikulären Extrasystolen und zu VHF (Youm et al., 2005). Wahrscheinlich spielt also mechanischer Stretch bei humanen VHF eine Rolle.

Mit der beobachteten Fragmentierung des GA bei VHF lassen sich auch Folgen für den Transport von Proteinen und sekretorischer Vesikel von intrazellulär in Richtung Zellmembran ableiten. Normalerweise richtet sich der GA mit dem MTOC und den Tubulinfilamenten zur Zellmembran hin aus, sodass ein gerichteter Transport durch die Motorproteine Dynein und Kinesin stattfinden kann (Vinogradova et al., 2012). Die MT von Interphase Zellen, die viele Transportvorgänge zu bewerkstelligen haben (MT von Neuronen, Epithelzellen, Melanozyten), besitzen ihren Ursprung entweder in den Zentrosomen (MTOC) oder im Golgi Komplex. Fragmentiert der GA in diesen Zellen, scheinen sich dementsprechend die MT nicht adäquat innerhalb der Zelle auszurichten (vgl. Kapitel 6.3) und es folgt wahrscheinlich ein ungerichteter Transport der im GA modifizierten Proteine und Vesikel (Zhu und Kaverina, 2013). Somit verliert die Zelle ihre Struktur und Ordnung. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Depolymerisation der MT (s. Kapitel 5.1.4) kann aber auch Ursache für die GA Fragmentierung sein, da die MT für den effektiven GA Aufbau essentiell sind (Hicks und Machamer, 2005; Vinogradova et al., 2012). Zerstört man die MT

experimentell mit Hilfe von Medikamenten (z. B. Colchicin oder Nocodazol), trennen sich die Golgi Zisternen. Sie zerbrechen daraufhin und verteilen sich im Zytoplasma (Thyberg und Moskalewski, 1999; Yang und Storrie, 1998). Der Golgi Komplex kann sich zwar über seine eigene MTOC Aktivität wieder aufbauen, jedoch werden so nur die Zisternen des GA gestapelt. Es wird allerdings keine Zellpolarität erreicht und der GA ist nur teilweise intakt. Für die beiden letztgenannten Punkte sind nämlich die MT unerlässlich, die ihren Ursprung entweder in dem Zentrosom der Zelle oder im Golgi Komplex haben (Zhu und Kaverina, 2013). Entlang der Tubulinfilamente werden die Golgi Bestandteile über die Motorproteine Dynein und Kinesin transportiert, um so die richtige Position und Formation innerhalb der Zelle zu erlangen (Vinogradova et al., 2012). Depolymerisieren die MT, wie bei VHF beschrieben (s. Kapitel 6.3), ist evtl. der gerichtete Transport von Proteinen innerhalb der Zelle gestört. Die Zellpolarität sowie die Zellbewegung entfallen und der GA Aufbau bzw. die GA Stabilität ist beeinträchtigt. Dies führt womöglich zu einer GA Fragmentierung. Es kommt wahrscheinlich zu einer Neu- und Umstrukturierung innerhalb der Zelle und somit zu einer veränderten Biophysilogie. Um den Zusammenhang zwischen dem GA und der MT zu verdeutlichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit der Vollständigkeit halber lineare Korrelationen zwischen den beiden Parametern errechnet (s. Kapitel 5.5.2, zur detaillierten Betrachtung s. Kapitel 12). Jedoch zeigten sich nur geringe lineare Abhängigkeiten, weil es wahrscheinlich dynamische, schwer erfassbare Prozesse zwischen beiden Variablen sind. Des Weiteren stellen die in der Arbeit untersuchten Vorhofmyokardproben einen Endzustand bzw. ein Ende des Vorganges der GA Fragmentierung dar, sodass lediglich schwache Korrelationen rechnerisch zu ermitteln sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zahlreiche Faktoren zu einer Zerstörung und veränderten Lage des GA bei VHF führen können. Es gibt multiple Genmutationen, die eine GA Fragmentierung verursachen, wie sie bereits bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet wurden (Mb. Parkinson, Muskeldystrophie vom Typ Duchenne, ALS, Mb. Alzheimer usw.). Allerdings erfordert diese Vermutung aufbauende Untersuchungen von Patienten mit alleinigem VHF, um eine Effektüberlagerung durch Nebenerkrankungen auszuschließen. Des Weiteren sind ein gestörtes Calciumgleichgewicht, Östrogenmangel, ein niedriger pH-Wert und eine intrazelluläre Akkumulation von

Cholesterol als mögliche Ursache für eine Beeinträchtigung des stabilen Golgi Komplexes bei VHF zu nennen. Auch mechanische Irritationen, wie sie bei induziertem zyklischen Stretch vorkommen, können durch die veränderten Zug- und Dehnungskräfte eine GA Fragmentierung verursachen. Außerdem scheint eine Depolymerisation bzw. ein Abbau der zytoskeletalen MT eine Zerstörung des GA Komplexes zur Folge zu haben, was im nächsten Kapitel näher beleuchtet wird.

6.3 Ursachen und Folgen der Depolymerisation der MT bei VHF

Die Auswertung der humanen Vorhofmyokardzellen zeigte, dass bei den SR Kardiomyozyten signifikant mehr Tubulinfilamente vorkamen, die länger als zehn μm waren. In der VHF Gruppe fanden sich weniger. Diese Feststellung lässt vermuten, dass es bei VHF zu einer Depolymerisation bzw. Zerstörung der MT als zytoskeletaler Bestandteil der Herzmuskelzellen kommt (s. Kapitel 5.1.4).

Herzerkrankungen schwächen auf Dauer das Herz und sensibilisieren es auf Situationen der Hypoxie. Eine aus Herzerkrankungen resultierende Ischämie des Myokards verursacht bereits ab zehn Minuten in vivo eine Zerstörung des Zytoskeletts, der Zellorganellen und der kontraktilen Proteine (Hein et al., 1995). Das Zytoskelett hat eine höhere ischämische Toleranz als die anderen Bestandteile. Dennoch kommt es zu einer Zerstörung und Depolymerisation der MT mit einer daraus resultierenden kontraktilen Dysfunktion der Kardiomyozyten. Das stabilisiert VHF und erhält es aufrecht (Zhang et al., 2014). Es kann sogar zum irreversiblen Zelluntergang kommen (Hein et al., 1995). Hu und Mitarbeiter fanden 2009 heraus, auf welchem genauen Weg Sauerstoffmangel in Kardiomyozyten zu einer Zerstörung der MT führt. Hypoxie verursacht zum einen eine Phosphorylierung und somit Inaktivierung des MAP4, zum anderen eine Dephosphorylierung und folglich Aktivierung von Stathmin. Beide Prozesse führen zur MT Zerstörung und zu einem verkürzten Überleben der Zelle. Dies geschieht über den *p38/mitogen-activated protein kinase* (p38/MAPK) Signalweg, der bei Sauerstoffmangel aktiviert wird (Hu et al., 2009). Neben verschiedenen Herz-Kreislaferkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit, Kardiomyopathien und dem obstruktiven Schlafapnoe Syndrom, verursacht auch VHF wegen der veränderten Zug- und Dehnungskräfte (Dhein, 2011) oxidativen Stress und Hypoxie. Wegen der fehlenden rhythmischen Vorhofkontraktion am Ende der

Diastole erhöht sich bei VHF der atriale Blutfluss sowie der atriale Blutdruck. Das steigert den Sauerstoffverbrauch und löst im Verlauf der Erkrankung Ischämien und Fibrosierungen aus (White et al., 1982). Einen weiteren Beleg dafür, dass VHF einen Sauerstoffmangel bewirkt und somit o. g. Prozesse für die MT Zerstörung zuständig sein könnten, brachten Ogi und Kollegen (2010). Sie wiesen nach, dass VHF durch den erhöhten Energiebedarf der Zellen einen Sauerstoffmangel im atrialen Gewebe mit sich bringt. Diese bei VHF auftretende Hypoxie führt zur Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1), welcher wiederum die Ausschüttung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) triggert. Der VEGF veranlasst die vermehrte Bildung der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9), die u. a. für die strukturellen Remodelingprozesse, wie Fibrosebildungen und myokardiale Dysfunktionen bei VHF mit verantwortlich ist. Sauerstoffmangel ist aber nicht nur eine Folge, sondern auch eine Ursache für VHF. So stellen einige pulmonalen Erkrankungen, die mit einem Sauerstoffmangel einher gehen, wie eine reduzierte Lungenfunktion oder das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom, Risikofaktoren dar, an VHF zu erkranken (Workman und Rankin, 2010). Letztendlich ist es also möglich, dass die Hypoxie bei VHF den in dieser Arbeit beobachteten MT Abbau über den p38/MAPK Signalweg verursacht (Hu et al., 2009). Hu und Kollegen beschrieben außerdem, dass der p38/MAPK Inhibitor SB203580 die MT Depolymerisation verhindert. So ergeben sich womöglich neue Perspektiven, diesen Signalweg mit Medikamenten zu hemmen und dadurch die Hypoxie bedingte MT Zerstörung und folglich den Zelltod von Kardiomyozyten aufzuhalten. Bisher ist bekannt, dass Taxol als MT Stabilisator, bei in Kaninchenherzen induziertem VHF, die Kardiomyozyten vor oxidativem Stress sowie freien Sauerstoffradikalen schützt. Das kann die Entstehung von VHF in vitro verhindern (Xiao et al., 2010). Neben den bereits vorhandenen, auf die MT ausgerichteten Medikamente wie z. B. Taxol könnten die Erkenntnisse von Hu und Mitarbeitern (2009) ein neuer pharmakologischer Ansatz zur Therapie von VHF auf intrazellulärer Ebene sein.

Gap junction Proteine wie beispielsweise das Connexin 43 (Cx43) als Zell-Zell-Kontakte beeinflussen ebenfalls die Tubulinstabilität und Zellpolarität in den Kardiomyozyten. Eine Reduktion der Cx43 Konzentration im Mausmodell zeigte gestörte Anordnungen des MTOC und GA. Das destabilisierte die MT und beeinträchtigte somit die Zellpolarität sowie -motilität (Francis et al., 2011). Es ist

bekannt, dass Hypoxien und Ischämien die Cx43 Expression in atrialen Kardiomyozyten reduzieren (Severino et al., 2012). Außerdem kann Hypoxie auch in ventrikulären Myozyten zu einer Cx43 Internalisierung und dadurch Reduktion führen. Das beschrieben Danon und Kollegen 2012 in neonatalen Ratten. Da es bei VHF ebenfalls zu Hypoxien des Gewebes kommt, kann man annehmen, dass bei VHF ebenfalls das Cx43 verringert ist. Kato und Mitarbeiter stellten 2012 eine Umverteilung und Abnahme der Cx43 Konzentration im Tiermodell mit induziertem VHF fest (s. Abbildung 6-1).

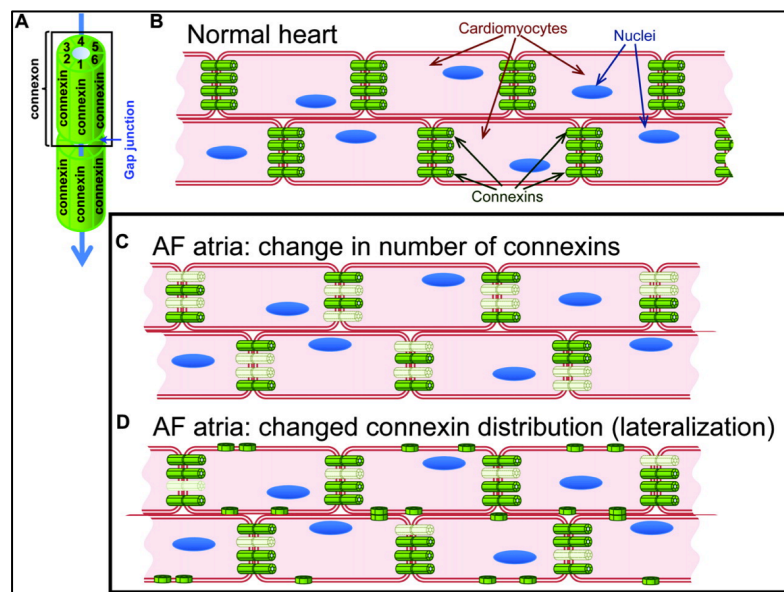


Abbildung 6-1 schematische Darstellung der Connexine (grün) in atrialen Myozyten (Kato et al., 2012)

A: Connexine bestehen aus 6 Connexonen, Connexine dienen der Zellkommunikation über gj, indem sie benachbarte Zellen miteinander elektrisch verbinden, B: physiologische Verteilung der Connexine im Herzen, C: VHF führt zu einer Reduktion der Connexine, D: VHF führt zu einer Lateralisierung der Connexine

Diese Beobachtungen konnten auch bei humanen atrialen Myokardproben von Patienten mit VHF nachgewiesen werden (Kostin et al., 2002 und Luo et al., 2007). Veränderungen in der Cx43 Expression scheinen also sowohl die Initiierung, als auch die Aufrechterhaltung von VHF zu verursachen. Die Aufrechterhaltung bzw. Stabilisierung von VHF ist aber auch durch z. B. elektrische Remodelingprozessen, wie die Lateralisierung der gj, bedingt (Dhein, 2011). Es ist möglich, dass die in dieser Arbeit beobachtete MT Zerstörung u. a. die Folge einer Cx43 Reduktion ist. Allerdings muss beachtet werden, dass in einigen Studien statt einer Reduktion eine Zunahme (z. B. Dhein et al., 2008) oder keine Veränderungen (z. B. Polontchouk et al., 2001) der Cx43 Expression bei

VHF beobachtet wurden. Das kann zum einen durch verschiedene Bedingungen in den Tiermodellen begründet sein (unterschiedliche Altersgruppen und Tierarten). Zum anderen kann es aber auch an differierenden Experimentabläufen, unterschiedlichen Cofaktoren bzw. bei humanen Untersuchungen an unterschiedlichen Patientengruppen ohne oder mit bestimmten Nebenerkrankungen, ungleichen VHF Stadien und VHF Proben (LA versus RA) (Severs et al., 2008; Dhein, 2006) liegen. Generell lässt sich zusammenfassen, dass eine Ischämie des Myokards zu einer Abnahme der Cx43 Konzentration führt (Fontes et al., 2012). So ist bei Patienten mit VHF und einer begleitenden koronaren Herzerkrankung eher eine Cx43 Reduktion zu erwarten (Yeh et al., 2002; Michela et al., 2015). Bei alleinigem VHF tritt hingegen eher eine Zunahme der Cx43 Konzentration auf (Wetzel et al., 2005). Die Erklärung des MT Abbaus wegen einer verringerten Cx43 Konzentrationen muss also differenziert betrachtet werden und kann nicht als alleinige Ursache für die MT Zerstörung angesehen werden. Vielmehr sind die beobachteten MT Veränderungen als ein multifaktorieller Prozess mit vielen verschiedenen beeinflussenden Parametern zu deuten.

Eine weitere mögliche Ursache für die Depolymerisation der MT bei VHF kann ein erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen sein. Schliwa und Kollegen fanden 1981 heraus, dass es in Nierenzellen von Affen zu einem MT Abbau kam, wenn der Calciumspiegel intrazellulär anstieg. Hori und Mitarbeiter (1994) untersuchten den Zusammenhang zwischen einem intrazellulärem Calciumüberschuss und dem MT Abbau in Kardiomyozyten neonataler Ratten. Eine Aktivierung von β -Rezeptoren durch Katecholamine führte zu einem Calciumeinstrom in die Herzmuskelzellen. Das verursachte bereits nach 30 Minuten eine Depolymerisation der MT. Abnormale Calciumspiegel in atrialen Herzmuskelzellen, die durch oxidativen Stress entstehen können, sind an der Initiierung und Aufrechterhaltung von VHF beteiligt (Wijesurendra und Casadei, 2015). Das liegt erstens daran, dass ein gestörtes Calciumgleichgewicht verzögerte Nachdepolarisationen auslösen und so Arrhythmien triggern kann. Zweitens kommt es durch eine Calcium Dysbalance zu einer gesteigerten Aktivität der CaMKII. Die gesteigerte Aktivität der Kinase geht mit einer Hyperphosphorylierung und erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR2 einher, der sich in der Plasmamembran des SpR befindet. Diese „undichten“ RyR2 Kanäle führen zu einem Calciumleck aus dem SpR mit

spontaner Calciumfreisetzung nach intrazellulär, was ebenfalls verzögerte Nachdepolarisationen triggern und VHF induzieren sowie stabilisieren kann (Heijman et al., 2014). Drittens bewirkt eine gestörte Calcium-Homöostase eine Zunahme des Natrium/Calcium Austauschers, das wiederum zu einem verstärkten Natriumeinstrom in die Zelle und einem abnormalen Calciumausstrom aus der Zelle führt (Wijesurendra und Casadei, 2015). Ein verändertes Calciumgleichgewicht ist aber auch eine Folge des elektrischen Remodelings, das durch chronisches, lang anhaltendes VHF entsteht und die Erkrankung aufrechterhält (Nattel und Harada, 2014). VHF bewirkt eine Reduktion der L-Typ Calcium Kanäle, eine oben bereits genannte Hochregulation des Natrium/Calcium Austauschers, einen verringerten Calciumstrom und eine veränderte Funktion des SpR. Alle diese Veränderungen können einerseits als Anpassung an das Calcium Überangebot während der schnellen atrialen AP bei VHF gewertet werden (Gomez-Hurtado und Knollmann, 2014). Andererseits begünstigen die Veränderungen aber auch Reentrykreisläufe, indem z. B. die Reduktion der L-Typ Calcium Kanäle die Refraktärzeit der Arbeitsmyokardzellen verkürzt, was Arrhythmien fördert (Ferreira und Santos, 2015). Festzuhalten ist, dass sowohl bei der Initiierung als auch bei der Aufrechterhaltung von VHF im Rahmen des elektrischen Remodelings spontane Calciumentladungen und damit auch verzögerte Nachdepolarisationen sowie fokale Triggerarrhythmien erleichtert werden (Gomez-Hurtado und Knollmann, 2014). Die vermehrten Calciumentladungen können an dem in vorliegender Arbeit beobachteten MT Abbau mit beteiligt sein. Es ist aber auch möglich, dass eine primär stattfindende MT Zerstörung eine Reduktion der L-Typ Calciumkanäle mit sich bringt und damit elektrische Remodelingprozesse und eine Stabilisierung von VHF fördert. Diese Vorgänge wurden bei epigenetisch reguliertem VHF registriert. Eine Aktivierung der Histon Deacetylase bewirkte eine Deacetylierung von Tubulin und somit ein MT Abbau. Aus diesem MT Abbau ergaben sich reduziert vorkommende Calciumkanäle und kontraktile Dysfunktionen der Myozyten (Zhang et al., 2014).

Die veränderten mechanischen Zug- und Dehnungskräfte, die auf die Kardiomyozyten einwirken, sind ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese des VHF. Diese Kräfte kann man auch als akuten mechanischen Stretch bezeichnen, der als Stimulus für VHF gilt (Walters et al., 2014). Der Vorgang der mechanischen Dehnung diente bereits in einigen Studien dazu, VHF in

verschiedenen Modellen zu simulieren und dadurch Rückschlüsse auf strukturelle, elektrische und mechanische Folgen zu ziehen. Es konnte gezeigt werden, dass zyklischer Stretch von humanen Lungenzellen in vitro eine Depolymerisation des MT Netzwerkes verursachte (Geiger et al., 2006). Die Arbeitsgruppe von Geiger beschrieb bereits nach 30 Minuten Stretch eine Reduktion des polymerisierten Tubulins im Vergleich zu ungestreckten Kontrollzellen. Auch ein Stretch von Nervenzellen führte zu einem Abbau der MT. Kikukawa und Kollegen untersuchten 2003 an adulten Ratten, welche Auswirkungen einstündiger Stretch auf die Nervenzellen des Plexus brachialis und Nervus medianus hatten. Es kam zu einer Reduktion der MT und von Tau, das ein Stabilisatorprotein der MT ist und den MT Aufbau begünstigt. Die Ergebnisse der Forschungsgruppe von Kikukawa sprachen also am ehesten für eine MT Depolymerisation wegen verminderter Tau Konzentrationen, verursacht durch mechanische Dehnung. Allerdings gibt es auch Studien, die eine Proliferation der MT durch Stretch feststellten. Yutao und Mitarbeiter (2006) untersuchten ventrikuläre Myozyten neonataler Ratten und deren Antwort auf mechanischen Stress. Es zeigte sich eine gesteigerte MT Polymerisation. Außerdem scheinen polymerisierte MT linksventrikuläre Arrhythmien zu begünstigen, da unter Taxol als MT Stabilisator vermehrt Herzrhythmusstörungen auftraten (Parker et al., 2001). Gegensätzlich dazu beschrieben Xiao und Kollegen (2010) einen protektiven und verhindernden Effekt von Taxol bezogen auf VHF. Anscheinend weisen die MT vielseitige, noch nicht vollständig geklärte Eigenschaften sowie Interaktionen auf, die weitere Untersuchungen zur Konkretisierung benötigen.

Des Weiteren können die Dehnungskräfte, die bei VHF wirken, Ionenkanäle aktivieren. Diese sogenannten *Stretch-activated ion channels* (SAIC) wurden erstmals 1984 von Guharay und Sachs in Skelettmuskelzellen von Hühnern entdeckt und befinden sich nahezu in allen Organismen und Geweben (Sokabe et al., 1991). Diese Kanäle sind wahrscheinlich mit dem Zytoskelett verbunden. Mechanischer Stretch erhöht die Zellmembranspannung und aktiviert über das so gedehnte Zytoskelett die SAIC (Sokabe et al., 1991). Die aktivierten Ionenkanäle induzieren eine erhöhte Permeabilität für Kalium und Chlorid (Kohl et al., 2006), aber auch für Natrium und Calcium, was zu Depolarisationen führen und somit APs auslösen kann (Zhang et al., 2000; Ruknudin et al., 1993). Stretch und die SAIC begünstigen also Arrhythmien und scheinen bei VHF eine wesentliche Rolle

zu spielen. Somit entstehen Ideen für eventuelle neue Therapieansätze, diese Ionenkanäle mit Pharmaka zu blockieren und so Herzrhythmusstörungen zu minimieren bzw. zu behandeln (Reed et al., 2014). Die in dieser Arbeit beobachteten MT Depolymerisationen können also sowohl durch den direkten Einfluss des Stretches auf die MT, als auch durch den erhöhten Calciumeinstrom der SAIC eine Erklärung finden.

Ang II ist ein Peptidhormon des RAAS, das zu einer Vasokonstriktion, Aldosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde sowie zu einer gesteigerten Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH) führt (vgl. Kapitel 1.2.2). Alle diese Wirkungen dienen der Blutdrucksteigerung (Fauci et al., 2008). Außerdem ist bekannt, dass durch VHF stimulierte Kardiomyozyten vermehrt Ang II produzieren können (Burstein et al., 2008). Deshalb wird angenommen, dass es bei VHF zu einer vermehrten Wirkung von Ang II im Herzen kommt, das zu elektrischen und strukturellen Remodelingprozessen führt (Novo et al., 2008) (s. Kapitel 1.2.2). Einerseits verursacht Ang II eine Verkürzung der AP-Dauer und somit elektrische Veränderungen in den Herzmuskelzellen. Das begünstigt VHF und erhält es aufrecht (Dhein, 2011; Novo et al., 2008). Andererseits aktiviert Ang II kardiale Fibroblasten, die ein strukturelles Remodeling der extrazellulären Matrix mit atrialen Fibrosebildungen bewirken (Burstein et al., 2008). Des Weiteren stimuliert Ang II die Synthese des proarrhythmogen wirkenden Kollagens und hemmt die Kollagenaseaktivität (Novo et al., 2008). So entstehen strukturelle und elektrische Erregungsweiterleitungsstörungen. Es ist auch bekannt, dass es bei VHF zu einer erhöhten Expression des Ang II Rezeptors AT_1 im LA kommt. Das begünstigt ebenfalls hypertrophe Prozesse, wie Fibrosierungen des Myokards (Boldt et al., 2003). Es ist somit gut nachvollziehbar, dass Medikamente wie AT_1 Rezeptor Blocker und ACE-Hemmer zur VHF Therapie eingesetzt werden. Sie greifen erfolgreich in den Remodelingprozess ein und begrenzen ihn teilweise (Fauci et al., 2008). Bereits 1993 wurde festgestellt, dass Ang II die MT Struktur von Myozyten schädigen kann (Hori et al.). Hashimoto-Komatsu und Kollegen untersuchten 2011 den Zusammenhang zwischen Ang II und der MT in Endothelzellen. Ang II begünstigte die Deacetylierung von α -Tubulin und somit den Abbau der MT. Außerdem stimulierte uniaxialer Stretch die Ang II Ausschüttung und Tubulin-Deacetylierung (Hashimoto-Komatsu et al., 2011). Es ist also denkbar, dass die gesteigerte

Wirkung von Ang II bei VHF den MT Abbau fördert.

Cunha und Kollegen (2011) entdeckten einen Zusammenhang zwischen verringertem Ankyrin-B und genetisch bedingtem VHF. Ankyrin ist ein Adapterprotein, das Membranproteine mit dem Zytoskelett verbindet (Smith et al., 2012). Es transportiert außerdem die Zellorganellen innerhalb der Zelle an ihren korrekten Platz (Alberts et al., 2007). Das wird durch einen Komplex aus Dynein, Ankyrin und Spektrin sowie einem Dynactin Komplex gewährleistet (s. Abbildung 6-2, Alberts et al., 2007).

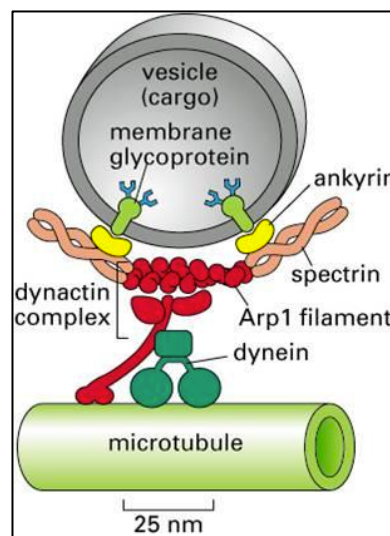


Abbildung 6-2 schematische Darstellung der Verbindung zwischen Zytoskelett und einer membrannahen Zellorganelle über multiple Proteine (Alberts et al., 2007)

Das Motorprotein Dynein (dunkelgrün) und der Dynaktinkomplex (rot) sind an die MT (hellgrün) gebunden und dienen der Stabilisierung einer zellmembrannahen Organelle (grau) innerhalb der Zelle. Das erfolgt über die Verbindung des Komplexes mit den Proteinen Spektrin (rosa) und Ankyrin (gelb), die mit der Zellorganelle verbunden sind.

Ankyrin kommt in vielen erregbaren Zellen vor, z. B. in Neuronen, β -Zellen des Pankreas sowie in atrialen Kardiomyozyten. Dysfunktionen in diesem Protein können zu neuronalen Defekten, neonatalem Diabetes oder Arrhythmien führen. Patienten, die eine Mutation im Ankyrin-B Gen mit folglichem Funktionsverlust aufwiesen, entwickelten frühzeitig VHF (Cunha et al., 2011). Dieser Vorgang bestätigte sich auch in Mäusemodellen mit einem fehlerhaften Ankyrin-Gen. In den Modellen zeigte sich des weiteren eine Reduktion der L-Typ Calciumkanäle sowie verkürzte APs (Cunha et al., 2011). Da das Adapterprotein Ankyrin mit den MT in Verbindung steht (s. Abbildung 6-2), ist es möglich, dass eine Reduktion bzw. verminderte Expression dessen zu einer Störung der MT mit eventueller

Depolymerisation führt. Eine Ankyrinreduktion in atrialen Kardiomyozyten kann also möglicherweise als eine weitere Ursache für den in dieser Arbeit beobachteten MT Abbau in Erwägung gezogen werden. Allerdings muss beachtet werden, dass die von Cunha und Kollegen beobachteten Ankyrinveränderungen bisher nur mit genetisch bedingtem VHF in Verbindung gebracht wurden und nicht mit sekundärem, auf dem Boden von diversen Vorerkrankungen entstandenem VHF. Es bleibt also offen und bedarf weiterer Untersuchungen, ob eine Ankyrinreduktion mit eventuell folgender MT Depolymerisation bei sekundärem VHF eine Rolle spielt.

Eine weitere Ursache für die Depolymerisation der MT kann die bereits in Kapitel 6.2 erläuterte Fragmentierung des GA sein. Der GA ist unerlässlich für die korrekte Formation, Dynamik und Entstehung der MT (Haase und Rabouille, 2015). In gesunden Interphase Zellen haben die MT entweder in den Zentrosomen (auch MTOC genannt) oder im GA ihren Ursprung und orientieren sich in Richtung der Zellmembran. Die Golgi Membranen sind also für den Aufbau und für die Stabilisierung der nicht zentrosomal entstehenden MT mit zuständig (Chabin-Brion et al., 2001). Fragmentiert nun der GA, wie bei VHF oder anderen vor allem neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben (vgl. Kapitel 6.2), ist der MT Aufbau gestört. Daraus kann ein MT Abbau folgen (Zhu und Kaverina, 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Vervollständigung der Ergebnisse untersucht, ob sich dieser Zusammenhang rechnerisch in Form von linearen Korrelationen belegen lässt (s. Kapitel 5.5.2 und 12). Es waren jedoch nur leichte Tendenzen zu erkennen. Das mag zum einen an nicht simultan ablaufenden Prozessen zwischen MT Zerstörungen und GA Fragmentierung liegen. Zum anderen sind die Vorgänge dynamisch und mit Momentaufnahmen bzw. -werten schwer zu erfassen, sodass die Korrelationen lediglich geringe Abhängigkeiten zum Ausdruck bringen.

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass viele verschiedene Faktoren die in dieser Arbeit festgestellte MT Depolymerisation bei VHF erklären können. So scheinen neben einer Hypoxie und Ischämie auch ein Connexinmangel zu einem MT Abbau zu führen. Des Weiteren bringen ein veränderter Calciumeinstrom in die Zellen, mechanischer Stretch sowie die durch Stretch aktivierten Ionenkanäle eine Zerstörung der MT mit sich. Außerdem können eine vermehrte Wirkung von

Ang II, ein Ankyrin-B Mangel sowie eine Golgifragmentierung mögliche Ursachen für den beobachteten MT Abbau bei VHF sein.

6.4 Zusammenhang zwischen Stathmin, MT und GA bei VHF

Stathmin ist ein in allen eukaryontischen Zellen vorkommendes Regulatorprotein der MT. Es verhindert deren weiteren Aufbau und aktiviert deren Abbau. Das geschieht, indem sich Stathmin an die α - und β -Untereinheiten des Tubulins bindet und so die Polymerisation, also den Aufbau, verhindert. Durch eine Anlagerung an die Enden der MT kann Stathmin auch direkt den Abbau induzieren (Alberts et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die phosphorylierte Form des Stathmins, das sog. Anti-Stathmin untersucht. Die Phosphorylierung des Proteins an seinen Serinresten führt zu schwachen Stathmin-Tubulin Bindungen, sodass die hemmende Wirkung auf die MT entfällt und der Aufbau wieder erfolgen kann (Steinmetz, 2007; Uchida und Shumyatsky, 2015). Diese Phosphorylierung von Stathmin ist für den Aufbau des Spindelapparates bei Mitosebeginn essentiell. Ohne diese Phosphorylierung käme es zu keinem MT Wachstum mit folglich ausbleibenden Spindelapparat, was einen Stopp im Zellzyklus mit sich bringen würde (Steinmetz, 2007). Stathmin, das auch Oncoprotein 18 genannt wird, spielt in der Pathogenese von Karzinomen und stark proliferativen Zellen eine Rolle. Niedrige Stathminwerte sind mit einer besseren Prognose bei z. B. Brustkrebs assoziiert, da sie mit einer verstärkten MT Stabilität einher gehen (Baquero et al., 2012). Stathmin kann also sowohl als Prognoseparameter bzw. Biomarker als auch als medikamentöser Therapieansatz für Chemotherapeutika in Betracht gezogen werden (Meng et al., 2012).

Die Anti-Stathmin Verteilung war bei den SR und VHF Gruppen ähnlich und wies keine signifikanten Unterschiede auf (s. Kapitel 5.2). In dieser Arbeit erfolgte die perinukleäre Betrachtung des phosphorylierten Stathmins (vgl. Kapitel 4.5.2). Dort findet die Golgifragmentierung statt, sodass in diesem Bereich eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Protein, GA und der MT detektiert werden sollten. Außerdem wurden lineare Korrelationen erstellt, um die Abhängigkeiten rechnerisch zu untermauern (s. Kapitel 5.5.2 und 12). Jedoch fielen sowohl mikroskopisch, als auch quantitativ keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf. Das liegt wahrscheinlich daran, dass viele verschiedene Proteine und

Signalwege für die De- und Polymerisation der MT sowie für die GA Fragmentierung mit zuständig sind. Außerdem scheinen die Vorgänge um Stathmin transiente Prozess zu sein, die sich womöglich nicht mit Momentaufnahmen bzw. -werten erfassen lassen. Weiterhin stellen die Vorhofmyokardproben, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, einen Endzustand des Herzmuskelgewebes dar, sodass die intrazellulären Vorgänge scheinbar schwer bzw. kaum zu detektieren sind.

Es ist bekannt, dass es bei einigen Erkrankungen zu Dysregulationen von Stathmin mit resultierender GA Fragmentierung, defekten MT und Zelltod kommen kann (Haase und Rabouille, 2015). Deshalb lag die Vermutung nahe, auch bei VHF veränderte Stathminkonzentrationen vorzufinden. Strey und Mitarbeiter wiesen 2004 an Mäusemodellen nach, dass eine mutierte Kupfer/Zink Superoxiddismutase 1 (SOD 1) Ursache für eine familiär bedingte ALS sein kann. Diese mutierte SOD 1 bringt wahrscheinlich Dysregulationen im Proteinstoffwechsel von Stathmin mit sich, indem es ansteigt und die phosphorylierte, MT stabilisierende Form abfällt. Stathmin scheint infolgedessen im Zytoplasma der Motoneurone des Rückenmarks zu akkumulieren. Das bewirkt eine Fragmentierung des GA und einen Zelltod der Neurone, monatelang bevor die Betroffenen durch Paralyse o. ä. symptomatisch werden. Das konnte auch durch Bellouze und Kollegen (2016) bestätigt werden. Eine Überexprimierung von Stathmin in HeLa Zellen führte ebenfalls zu einer GA Zerstörung sowie zu einer Zerstörung der MT (Strey et al., 2004). Eine mutierte SOD 1 bei familiär bedingter ALS scheint zusätzlich einen Zelltod der Motoneurone über Fas aktivierte Caspasen zu triggern und so GA Fragmentierungen zu begünstigen (Raoul et al., 2002). Auch bei der spinalen Muskelatrophie (SMA) im Mausmodell kam es zu einem gesteigerten Anteil an Stathmin. Daraus resultierten MT Defekte, Axondegenerationen und Verluste von neuromuskulären Synapsen (Wen et al., 2010). In adulten Gehirnzellen von Patienten mit Mb. Alzheimer und Down-Syndrom zeigte sich hingegen eine reduzierte Konzentration des MT destabilisierenden Stathmins (Cheon et al., 2001). Dennoch akkumulierte Stathmin in einigen Neuronen und bei Mb. Alzheimer wurden sogar fragmentierte GA vorgefunden (Strey et al., 2004). Stathmin scheint also eine entscheidende Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen mit Mutationen in der SOD 1 zu spielen. Allerdings sind noch weiterführende Untersuchungen nötig, um

deutlichere MT Veränderungen und GA Fragmentierungen in vivo festzustellen. Beispielsweise sind feiner auflösende Techniken in der Erhaltung und Visualisierung der MT anzustreben, wie elektronenmikroskopische 3D-Rekonstruktionen, um einen Zusammenhang zwischen Stathmin Überexprimierungen, mutierter SOD 1 und GA Pathologien herstellen zu können (Haase und Rabouille, 2015).

Die Vermutung, dass Stathmin bei VHF eine Rolle spielt, lässt sich durch die bereits in Kapitel 6.3 diskutierten Untersuchungen von Hu und Mitarbeitern begründen (2009). Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass Hypoxie in Kardiomyozyten zu einer Aktivierung von Stathmin führt. Diese Aktivierung bewirkt eine MT Depolymerisation und ein daraus folgendes reduziertes Überleben der Zellen. MT Stabilisatoren wie Taxol konnten VHF in vitro verhindern (Xiao et al., 2010). Auch ein durch Sauerstoffradikale verursachter oxidativer Stress und die damit verbundenen mitochondrialen Dysfunktionen induzierten einen erhöhten Stathminspiegel im Mausmodell und dadurch einen MT Abbau (Li und Chan, 1998). Ein erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen, wie es bei VHF anfangs auftritt, bewirkte in dendritischen Zellen hingegen eine Phosphorylierung von Stathmin und somit eine Stabilisierung der MT. Dieser Prozess erfolgte über die Aktivierung der CaMKII (Ohkawa et al., 2007).

Letztendlich zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit keine Anti-Stathminunterschiede zwischen den Gruppen SR und VHF. Gründe dafür können zum einen der dynamische Prozess zwischen Stathmin, phosphorylierten Stathmin, der MT und des GA sein. Dieser Prozess lässt sich womöglich nicht mit Momentaufnahmen bzw. mit den verwendeten Methoden erfassen. Zum anderen scheint die De- und Polymerisation der MT ein komplexer Vorgang mit multiplen mitwirkenden Proteinen und Signalwegen zu sein, der sich ebenfalls nur schwer detektieren lässt. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass Dysregulationen von Stathmin zu den festgestellten GA Fragmentierungen und MT Abbauprozessen mit evtl. resultierendem Zelltod führen können. Es ist vorstellbar, dass Hypoxie, oxidativer Stress und ein erhöhter intrazellulärer Calciumeinstrom die Stathminkonzentration bei VHF beeinflussen. Das würde zu Veränderungen des Zytoskeletts und der Zellorganellen in den Kardiomyozyten führen.

6.5 Aktivierung der Cdk 5 bei VHF und der Zusammenhang mit den MT, GA sowie Stathmin

Die Zyklin abhängige Kinase 5 (Cdk 5) ist eine Serin/Threonin Proteinkinase. Anders als die weiteren Kinasen aus ihrer Familie reguliert sie nicht direkt den Zellzyklus. Vielmehr wirkt sie in der Neuronen Entwicklung im Gehirn mit. Außerdem übernimmt die Cdk 5 Funktionen wie neuronales Wachstum, synaptische Plastizität und Phosphorylierung zytoskeletaler Proteine (Shukla et al., 2012). Des Weiteren ist die Cdk 5 essentiell für multiple neuronale Prozesse, die höhere kognitive Funktionen wie Lernen, Erinnerung, Schmerzbewusstsein usw. betreffen (Shah und Lahiri, 2016). Sie kommt aber auch in anderen Zellen, wie z. B. in Myozyten, β -Zellen des Pankreas, Monozyten, Leukozyten und Keimzellen vor (Rosales und Lee, 2006). Aktiv ist die Kinase im phosphorylierten Zustand. Diese Phosphorylierung bzw. Aktivierung erfolgt nicht wie bei den anderen Kinasen durch Zykline, sondern durch die Proteine p35 und p39. Diese Beiden binden sich an die Cdk 5 und verankern sie in der Zellmembran (Shukla et al., 2012). Bei der Spaltung von p35/39 zu p25/29 verteilt sich die Cdk 5 neu im Zytosol, um den Ncl. herum und perinukleär (s. Abbildung 1-3). Bei einer Überexprimierung kann der Komplex aus Cdk 5/p25 toxische Effekte triggern (Sun et al., 2008).

Die Cdk 5 kommt vorrangig in neuronalen Zellen vor. Dennoch bildet die Kinase einen Schwerpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit, da sie einen Stimulus zur GA Fragmentierung darstellt und auch in Muskelzellen vorkommen kann (Rosales und Lee, 2006). Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine GA Zerstörung beobachtet. Deswegen sollten die durchgeführten Experimente potenzielle Zusammenhänge zwischen der Cdk 5 und der GA Fragmentierung in Kardiomyozyten aufdecken. Die Cdk 5 befand sich in der SR Gruppe in der gesamten Herzmuskelzelle verteilt. In der VHF Gruppe stellte sich die Kinase eher an der Zellmembran dar (s. Kapitel 5.3). Das bedeutet, dass sie bei VHF an p35/39 gebunden und damit aktiver ist als bei SR. Vermutlich triggert die Cdk 5 die bei VHF beobachtete GA Zerstörung.

Sun und Kollegen (2008) ermittelten einen pathologischen Zusammenhang zwischen der Cdk 5 und einer GA Fragmentierung bei Mb. Alzheimer. Die aktivierte bzw. deregulierte Kinase phosphorylierte das GA Protein GM 130 und

induzierte so den Abbau des GA. Der Abbau konnte gestoppt werden, indem die Cdk 5 gehemmt wurde. Auch oxidativer Stress, Ischämien, mitochondriale Dysfunktionen, Entzündungen, Calcium Dysregulationen und Neurotoxine können zu einer Hyperaktivität der Cdk 5 führen, indem sie das intrazelluläre Calcium ansteigen lassen (Shukla et al., 2011). Hohe Calciumkonzentrationen aktivieren Calpain, das wiederum eine Spaltung des p35 zu p25 induziert. Es entsteht ein stabilerer, hyperaktiver Cdk 5/p25 Komplex, der eine längere Halbwertszeit besitzt und neurotoxische Kaskaden triggern kann. Der Komplex wandert von der Zellmembran in das Zellinnere und zum Ncl. Folglich kommt es z. B. bei Mb. Alzheimer zu einer Hyperphosphorylierung von Tau (ein in Axonen vorkommendes MAP) und Neurofilamenten (s. Abbildung 1-3), was zu Neurodegenerationen des Gehirns und zum Zelltod führt (Sun et al., 2008; Shukla et al., 2012). Außerdem verursacht der Cdk 5/p25 Komplex eine Aktivierung von p38 mit einer folgenden mitochondrialen Schädigung und Apoptose Induktion. Diese Vorgänge gehen bei Mb. Alzheimer, ALS, Mb. Parkinson und Chorea Huntington von statten (Shukla et al., 2012). Aufgrund dessen stellen Cdk 5 Inhibitoren evtl. neue Therapieansätze zur Behandlung o. g. Krankheiten dar (Gong und Iqbal, 2008). Es gibt allerdings auch in vitro Untersuchungen, die belegen, dass nicht nur die Cdk 5/p25 Komplexe toxisch wirken, sondern auch die Cdk 5/p35 Verbindungen. Die Kinetik beider Komplexe ist ähnlich und somit auch die Fähigkeit, Pathologien hervorzurufen (Peterson et al., 2010). Es liegt die Annahme nahe, dass auch die bei VHF neu entdeckte Cdk 5 Aktivierung (s. Kapitel 5.3) die GA Fragmentierung unterstützt bzw. auslöst. Um diesen Zusammenhang quantitativ zu untermauern, wurden zusätzlich zu den mikroskopischen Auswertungen lineare Korrelationen für die beiden Variablen GA Fragmentierung und Cdk 5 erstellt (vgl. Kapitel 5.5.2, zur genaueren Betrachtung s. Kapitel 12). Allerdings ließen sich rechnerisch nur geringe Abhängigkeiten nachweisen. Das liegt wahrscheinlich darin begründet, dass der Zusammenhang zwischen GA Fragmentierung und Cdk 5 bisher nur im Gehirn nachgewiesen wurde. Eventuell besteht eine Abhängigkeit im Herzgewebe nicht in dieser Art und Weise. Außerdem ist zu bedenken, dass die Ergebnisse dieser Arbeit anscheinend das Ende des Prozesses darstellen. Eventuell sind deutlichere Abhängigkeiten in weiterführenden Untersuchungen darstellbar, die frühere Schritte der GA Fragmentierung erfassen.

Die Cdk 5 beeinflusst bei neurodegenerativen Erkrankungen neben der GA Zerstörung ebenso das Remodeling neuronaler MT. Einerseits acetyliert sie α -Tubulin und phosphoryliert Stathmin. Das stabilisiert die MT und baut sie auf. Andererseits phosphoryliert die Cdk 5 das *tubulin polymerization-promoting protein* (TPPP) und Tau, was wiederum in einem MT Abbau resultiert. Unter Calciumeinfluss kann p35 an Calmodulin binden. Das behindert ebenfalls den MT Aufbau (Shah und Lahiri, 2016). Eventuell werden auch bei VHF die MT durch den Cdk 5/p35 Komplex abgebaut. Aus diesem Grund erfolgte die Errechnung von linearen Korrelationen (s. Kapitel 5.5.2 und 12). Jedoch zeigten sich rechnerisch keine Abhängigkeiten, sodass sich ein Zusammenhang zwischen den MT und der Cdk 5 nur vermuten lässt. Die Kinase beeinflusst sowohl den MT Aufbau als auch den Abbau, sodass sich die in dieser Arbeit beobachtete MT Depolymerisation mit der Cdk Aktivität nicht sicher erklären lässt.

Des Weiteren scheint ein erhöhtes intrazelluläres Calcium und Hypoxien bzw. Ischämien die Cdk 5 zu aktivieren. In Experimenten führte das zum Zelltod (Rashidian et al., 2005). Ebenso zeigten Tan und Kollegen (2015) in ihren Untersuchungen an neonatalen Ratten mit induziertem Apoplex, dass es zu einer gesteigerten Aktivität der Cdk 5 kam. Dies belegten sie mit vermehrt vorkommenden phosphorylierten Taukonzentrationen und Glukokortikoidrezeptoren. Das sind zwei Marker für die Aktivität der Kinase. Sie werden bei Hypoxien und Ischämien verstärkt gebildet. Eine Überaktivierung der Kinase ist mit einem neuronalem Zelltod assoziiert, sodass Cdk 5 Inhibitoren als therapeutische Ansatzpunkte gegen Apoplex induzierte neuronale Zelluntergänge im ischämischen Hirngewebe in Erwägung gezogen werden. Außerdem stimuliert oxidativer Stress die Cdk 5 Aktivität. Es induziert eine gesteigerte Expression der regulatorischen Einheit p35, ohne dass es zu einer Calpain bedingten Spaltung zu p25 kommt (Strocchi et al., 2003). Auch bei VHF entsteht ein Sauerstoffmangel im Gewebe. Außerdem kann es zu einem erhöhten intrazellulärem Calcium und zu oxidativem Stress in den Zellen kommen. So ist es möglich, dass die Cdk 5 aufgrund der genannten Faktoren bei VHF aktiver ist als bei SR.

Eine Studie von Qi und Mitarbeitern (2016) beleuchtete den Zusammenhang zwischen einer aktivierten Cdk 5 und dem gj Protein Cx43 in neuronalen Zellen von Ratten. Die hochregulierte Cdk 5 phosphorylierte und beeinflusste direkt das Cx43. Das führte zu einer reduzierten Expression von Cx43, zu veränderten

Membranlokalisationen in den Neuronen und zu einem erhöhten Abbau von Cx43 über den Proteasomen Signalweg. Die Wirkungen der Cdk 5 auf die Membranlokalisation von Cx43 wurden als verhindert bzw. blockiert beschrieben. Damit liegt die Vermutung nahe, dass es zu einem reduzierten Cx43 Einbau in die Zellmembranen kam. Bei VHF ist die Cdk 5 ebenfalls aktiviert. Das bedeutet, dass die Kinase womöglich auch in den Kardiomyozyten für eine Reduktion sowie veränderte Membranlokalisation des Cx43 mit verantwortlich ist. Es ist also durchaus denkbar, dass diese Vorgänge weitere Ursachen für die elektrischen Remodelingprozesse bei VHF sind, da Veränderungen in der Expression und Lage von Cx43 Arrhythmien begünstigen und so Herzrhythmusstörungen auslösen bzw. stabilisieren können (Kostin et al. 2002; Luo et al., 2007). Außerdem scheinen die Cx43 Umgestaltungen Störungen in der Anordnung des MTOC und GA mit sich zu bringen. Das destabilisiert möglicherweise die MT und beeinträchtigt somit die Zellpolarität sowie -motilität (vgl. Kapitel 6.3) (Francis et al., 2011).

Die Cdk 5 und ihre Bindungspartner spielen also für eine Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle und stellen eventuelle therapeutische Ansatzpunkte für die Zukunft dar. Medikamente wie Roscovitin, Flavopiridol oder Calpain Inhibitoren (Hung et al., 2005; Gong und Iqbal, 2008), die alle den Cdk 5/p25 Komplex hemmen, stellen potenzielle pharmakologische Therapiemöglichkeiten dar. Jedoch ist die Wirkung der Medikamente noch sehr unspezifisch, da sie alle Kinasen in allen Zellen beeinflussen und so die Zellzyklen hemmen. Zur Zeit würden so noch die Nebenwirkung den Nutzen überwiegen (Gong und Iqbal, 2008).

Bei VHF kommt es zusammenfassend zu einer Aktivierung der Cdk 5. Sie kam signifikant mehr an der Zellmembran der Kardiomyozyten vor, als bei der SR Gruppe. Ursachen für diese Aktivierung können oxidativer Stress, Ischämien bzw. Hypoxien und Calcium Dysregulationen sein, die sich wahrscheinlich auf den GA, die MT und Cx43 Expression auswirken sowie apoptotische Prozesse triggern.

6.6 Gleiche Verteilung von Anti-GM 130 und phospho-GM 130 bei SR und VHF

GM 130 ist ein cis-Golgi Matrixprotein, das in den meisten eukaryontischen Zellen vorkommt. Während der Prophase der Mitose wird das Protein durch die Cdk 2 an einem Serinrest zu phospho-GM 130 phosphoryliert. Das löst die Bindung zwischen GM 130 und p115 auf und bewirkt eine Fragmentierung des GA (Lowe et al., 2000; Sundaramoorthy et al., 2010). In der Telophase der Mitose sorgt das zytosolische Phosphoprotein p115 für den Wiederaufbau des GA, indem es an GM 130 und Giantin bindet und so die Zisternen aneinander koppelt (Brandon et al., 2003).

Die phosphorylierte Form des GM 130 stellt einen Marker für einen fragmentierten GA dar. Deshalb wurde vermutet, dass es bei VHF mehr bzw. mit anderer Lokalisation vorhanden ist. Infolgedessen wurde dieses Protein in vorliegender Arbeit untersucht. Jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen SR und VHF. Das phosphorylierte GM 130 war in den beiden Gruppen wie das unphosphorylierte Anti-GM 130 verteilt. Beide Formen befanden sich in der SR Gruppe an den Zellkernpolen. In der VHF Gruppe zeigten sich beide Proteine lateral des Ncl. sowie in der gesamten Zelle zerstreut. Das bedeutet, dass beide Formen des GM 130 in beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Lage identisch waren und einander entsprachen (s. Kapitel 5.3). Daraus lässt sich schließen, dass der GA tatsächlich bei VHF zerstört wurde, da das phospho-GM 130 genauso zerstreut vorkam wie die unphosphorylierte Form. Bei der gesunden Kontrollgruppe ist auch die phosphorylierte Form und somit ein potenzieller Trigger für die GA Fragmentierung vorhanden. Allerdings ist der GA noch intakt. In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit bedeutet das womöglich, dass das phospho-GM 130 für eventuelle, bevorstehende GA Abbau-/Umbauprozesse bereit steht, aber zu keiner Fragmentierung führte.

6.7 Methoden und Limitationen

Die hier untersuchten Proben wurden während herzchirurgischer Operationen gesammelt. Es ist möglich, dass es bei der Probengewinnung zu unterschiedlichen Einwirk- und Fixierzeiten in Formalin kam. Das lag zum Teil an den verschiedenen und individuellen Operationsabläufen sowie am Operationssaalmanagement. Dennoch wurde versucht, den Entnahmezeitpunkt und die Dauer bis zur Fixierung in Formalin so kurz wie möglich zu gestalten, um die Proben untereinander vergleichbar zu machen.

Die gesammelten humanen Proben wurden in 1 µm dicke Schnitte geteilt, per Immunfluoreszenz angefärbt und mit Immunfluoreszenzmikroskopie bzw. Konfokalmikroskopie ausgewertet. Die Schnitte repräsentieren eine Art Scheibe aus der Herzmuskelzelle, die einen momentanen bzw. fixierten molekularen Zustand der Zelle widerspiegeln. Es handelt sich somit um untersuchte statische Momentaufnahmen anstatt um dynamische Prozesse, obwohl viele der betrachteten zellulären Vorgänge als aktiv und flexibel anzusehen sind. Für weitere v. a. quantitative Aussagen bezüglich der Anti-Stathmin oder phospho-GM 130 Verteilung für die Gruppen SR und VHF wären zusätzliche Methoden wie z. B. Western Blot Analysen nötig gewesen. Diese Ideen könnten aber evtl. in zukünftigen Experimenten umgesetzt werden.

Die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen kann durch differierende Einwirkzeiten der Antikörper, der Blockung, der Waschschrte o. ä. zu unterschiedlichen Signalstärken der Proteine führen. So ist es möglich, dass die Signale der Immunfluoreszenz entweder zu stark oder zu schwach erscheinen. Dadurch können eventuelle Überlagerungen mit anderen Zellmaterialien zu falschen Eindrücken und Bewertungen führen. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurden alle Schnitte nach institutsinternen, standardisierten und getesteten Protokollen angefärbt. Außerdem wurden vor jeder neuen Färbung Negativkontrollen durchgeführt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Um das Risiko von Überlagerungsartefakten zu reduzieren, wurde eine minimale Gewebeschnittdicke von 1 µm gewählt.

Die Probenanzahl der beiden Gruppen differiert stark zu Lasten der gesunden Kontrollgruppe. Das liegt in der Tatsache begründet, dass sich mehr Patienten mit VHF und valvulären Begleiterkrankungen einer Operation und Ablation

unterzogen haben und so mehr kranke Gewebeproben gewonnen werden konnten. Die SR Proben stammten primär von Patienten mit aortokoronaren Bypassoperationen. Jedoch sind Patienten mit einem gesundem Herzrhythmus, aber anderweitigen operationspflichtigen Herzerkrankungen selten. Vielmehr bestehen Komorbiditäten zwischen Klappen- bzw. Gefäßerkrankungen und Arrhythmien, sodass es schwierig ist, intraoperative Proben herzkranker Patienten mit gesundem Sinusrhythmus zu gewinnen. In weiterführenden Untersuchungen wäre also eine größere Kontrollgruppe als sinnvoll zu erachten.

Des Weiteren sind jüngere Patienten unterrepräsentiert, die wahrscheinlich eher genetisch bedingtes, alleiniges VHF aufweisen würden und die Folgen der Erkrankung so in einem früheren Stadium detektiert werden könnten. Viele der Patienten, von denen die Gewebeproben stammten, hatten Nebenerkrankungen. So bestanden neben VHF auch Krankheiten wie Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit, Herzklappenerkrankungen usw. Außerdem wiesen viele der Patienten ein erhöhtes Alter auf (vgl. Tabelle 4-1). Alter und Nebenerkrankungen können ebenfalls Remodelingprozesse auslösen. Deswegen ist es schwierig, VHF als alleinige Ursache für die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Arbeit zu sehen. Um dennoch andere Faktoren, wie eine reduzierte EF oder einen größeren Diameter des linken Vorhofs als Ursachen für die hier gewonnen Erkenntnisse auszuschließen, wurden lineare Korrelationen erstellt (s. Kapitel 5.5). Sie zeigten allesamt keinen funktionellen Zusammenhang zwischen der EF bzw. dem Diameter und der Ergebnisse dieser Arbeit.

6.8 Schlussfolgerung und Ausblick

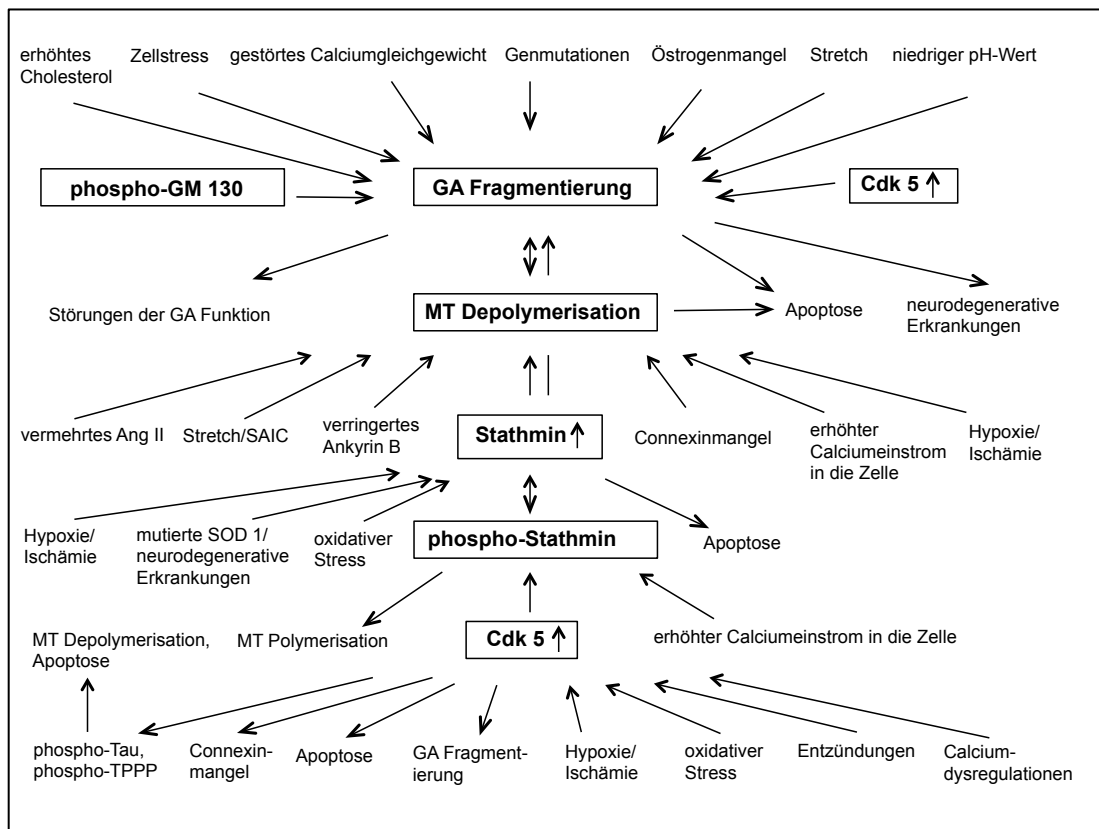


Abbildung 6-3 Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse bei VHF

In der vorliegenden Arbeit wurden der GA in Form von Anti-GM 130, die MT, phospho-Stathmin, Cdk 5 und phospho-GM 130 untersucht (fettgedruckte Kästchen). Diese Proteine werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Alle diese Faktoren spielen bei VHF eine Rolle und können zur Erklärung der beobachteten Veränderungen beitragen.

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung von intrazellulären strukturellen Remodelingprozessen bei VHF. Die gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 6-3 zusammengefasst. Die Abbildung stellt ebenfalls die Zusammenhänge der Ergebnisse untereinander sowie die beeinflussenden Faktoren, die bei VHF von Bedeutung sind, schematisch dar.

Die Ergebnisse zeigen, dass VHF zu einer Fragmentierung des GA führt. Es konnte bereits in vielen anderen Studien belegt werden, dass der GA bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. Mb. Alzheimer, Mb. Parkinson, ALS, Chorea Huntington usw. zerstört wird. Mögliche Ursachen für diese erstmals bei VHF beobachtete Golgi Fragmentierung sind Hypoxie, ein damit verbundener niedriger pH-Wert, ein gestörtes Calciumgleichgewicht, Östrogenmangel, intrazelluläre Akkumulationen von Cholesterin, mechanische Irritationen in Form

von Stretch, Depolymerisationen der zytoskeletalen MT, erhöhte Cdk 5 Aktivitäten und Genmutationen. Stathminanreicherungen, die zu einem Abbau der MT und so zu GA Zerstörungen führen würden, waren in vorliegenden Untersuchungen nicht nachweisbar. Es bestätigte sich auch nicht ein vermehrtes Vorkommen von phospho-GM 130, was ebenfalls in einem GA Abbau münden würde. So könnten zukünftige Untersuchungen in Form von z. B. Western Blots dazu dienen, eventuelle Unterschiede in der Gesamtmenge der Proteine Stathmin und phospho-GM 130 zwischen den Gruppen SR und VHF festzustellen.

Außerdem zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass es bei VHF zu einem Abbau der MT kommt. Das kann Apoptosen und damit verbundene Zelluntergänge mit sich bringen. Bei VHF könnten die Faktoren Hypoxie, erhöhte Calciumeinströme in die Zelle, mechanischer Stress in Form von Stretch, vermehrtes Ang II, Connexinmangel und ein verringertes Ankyrin B dieses Ergebnis erklären. Die Untersuchungen des phosphorylierten Stathmins brachten keine Unterschiede zwischen den Gruppen SR und VHF hervor, obwohl die Vermutung nahe lag, dass phospho-Stathmin bei VHF weniger vorkam. Stathmin ist ein Protein, das den MT Abbau fördert. Die phosphorylierte Form stabilisiert hingegen die MT und baut sie auf. Da es bei VHF zu einer MT Depolymerisation kam, hätte eben diese phosphorylierte Form weniger vorkommen müssen.

Die Ergebnisse der Cdk 5 verdeutlichten eine höhere Aktivität der Kinase bei VHF, da sie vermehrt nahe der Zellmembranen vorkam. Sie triggert ebenso wie o. g. Faktoren eine GA Fragmentierung. Ursachen für diese Aktivierung bezogen auf VHF sind oxidativer Stress, Ischämien bzw. Hypoxien und Calcium Dysregulationen. Diese Faktoren wirken sich auf den GA, die MT und die Cx43 Expression aus.

Die Untersuchungen von phospho-GM 130 ergaben keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Es wurde davon ausgegangen, dass dieses Protein vermehrt bei VHF vorkommt, da es zu einer GA Fragmentierung führt. Allerdings konnte dies nicht nachgewiesen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bringen neue Erkenntnisse über die intrazellulären Veränderungen bei VHF. Die weltweit häufigste tachykarde Herzrhythmusstörung beeinflusst direkt die Kardiomyozyten. Sie verändert Zellorganellen, das Zytoskelett und andere zelluläre Proteine. Alle diese

Prozesse sind wahrscheinlich sowohl an der Entstehung als auch an der Aufrechterhaltung des VHF beteiligt. Sie können als potenzielle kausale Therapieansätze angesehen werden. Eventuell bieten sich in Zukunft Möglichkeiten, die intrazellulären Veränderungen pharmakologisch zu beeinflussen und somit die strukturellen Prozesse bei VHF zu limitieren. Das könnte die Folgen von VHF evtl. minimieren. Inwieweit die hier festgestellten Veränderungen allerdings eine klinische Bedeutung in Form von Arzneimittelansatzpunkten haben, bleibt noch zu klären und erfordert aufbauende Untersuchungen. Des Weiteren bleibt offen, ob ähnliche Veränderungen bei anderen supraventrikulären Herzrhythmusstörungen zu finden sind, wie z. B. bei der AV-Knoten-Reentrytachykardie oder dem Wolff-Parkinson-White-Syndrom, die beide mit VHF assoziiert sind (Chang et al. 2008; Centurión et al. 2008). Interessant wären auch fortführende Gewebeuntersuchungen von jungen Patienten mit genetisch bedingtem, allein vorkommendem VHF. So könnten die Remodelingprozesse bei VHF spezifischer untersucht werden, ohne durch Begleiterkrankungen überlagert zu sein. Außerdem könnten eventuelle Genmutationen eruiert werden, die Zerstörungen des GA oder der MT begünstigen. Jedoch stellt sich die Gewebegewinnung als ethisch schwierig vertretbar dar. Des Weiteren können größere Kontrollgruppen dazu dienen, die hier dargestellten Ergebnisse zu verifizieren. Eine letzte Idee für auf diese Arbeit aufbauende Untersuchungen ist, Gewebeanalysen nach VHF Ablationen durchzuführen. So wäre einschätzbar, ob die festgestellten zellulären Veränderungen reversibel sind. In Studien und Tiermodellen induziertes VHF zeigte zum Teil reversible Veränderungen. Jedoch hielt die VHF Simulation selten länger als 48 h an, was mit humanen VHF nicht vergleichbar ist. Außerdem ist die humane Probengewinnung nach beendetem VHF als schwierig anzusehen.

7 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Intrazelluläre strukturelle Remodelingprozesse bei chronischem Vorhofflimmern
an humanen atrialen Myokardproben

eingereicht von: Luisa Jungk

angefertigt an der: Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig, Universität
Leipzig, Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Friedrich W. Mohr

betreut von: Prof. Dr. med. S. Dhein

eingereicht im: Oktober 2016

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste tachykarde Herzrhythmusstörung bei Erwachsenen. Sie geht mit veränderten Zug- und Dehnungskräften einher, die auf das Vorhofmyokard einwirken. Das Herzmuskelgewebe versucht sich in Form von Remodelingprozessen an die veränderten Belastungen anzupassen. Diese Anpassungen sind einerseits eine Folge der Arrhythmie, andererseits erhalten sie diese aber auch aufrecht. Die Remodelingprozesse geschehen auf elektrischer, mechanischer, metabolischer und struktureller Ebene.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die strukturellen Veränderungen auf intrazellulärer Ebene zu untersuchen und die Auswirkungen von VHF auf die atrialen Kardiomyozyten zu ermitteln. Dazu wurden 24 atriale Myokardproben von Patienten, die einen Sinusrhythmus (SR) aufwiesen, mit 129 atrialen Gewebeproben von an VHF erkrankten Patienten verglichen. Die 1 µm dicken Herzmuskelgewebeschnitte wurden mit Immunfluoreszenz gefärbt und anschließend mit Fluoreszenz- sowie teilweise auch Konfokalmikroskopie betrachtet, analysiert und ausgewertet. Der Fokus lag dabei auf dem Golgi-Apparat (GA), den Mikrotubuli (MT), dem phosphorylierten Stathmin, der Zyklin abhängigen Kinase 5 (Cdk 5) und dem phosphorylierten GM 130. Die Analysen verfolgten das Ziel, diese Zellbestandteile hinsichtlich ihrer Morphologie, Lage und Häufigkeit zwischen den Gruppen SR und VHF zu vergleichen.

Bei VHF kommt es zu einer Zerstörung und Fragmentierung des GA. Das zeigte sich in einer veränderten Lage und Morphologie des GA im Vergleich zu der SR Gruppe. Die SR Proben wiesen einen intakten und kompakten GA auf, der sich

an den Polen des Nucleus (Ncl.) befand. In der VHF Gruppe erschien der GA hingegen in viele kleine Bestandteile zerstört und war in der gesamten Zelle, v. a. auch lateral des Ncl. verteilt. Da der GA für Proteinmodifikationen und sekretorische Transportwege zuständig ist, können die GA Veränderungen zu gestörten intrazellulären Prozessen führen. Das wiederum kann zu Zellstress mit resultierenden Zelldegenerationen sowie Zelltod führen (Hicks und Machamer, 2005). Das hat Auswirkungen auf die gesamte zelluläre Homöostase, was in verschiedenen Erkrankungen münden kann (Bexiga und Simpson, 2013). Ursachen für die beobachtete GA Fragmentierung bei VHF können z. B. Calciumdysregulationen sein. Des Weiteren scheinen ein niedriger pH-Wert, Genmutationen, mechanische Dehnungen sowie eine Zerstörung der zytoskeletalen MT eine Rolle zu spielen.

Außerdem kommt es bei VHF zu einer Depolymerisation der MT. Sie erschienen in der VHF Gruppe kürzer und zerstörter als in der SR Gruppe. Aus der MT Depolymerisation können kontraktile Dysfunktionen der Kardiomyozyten resultieren. Das wiederum scheint das VHF zu stabilisieren und aufrechtzuerhalten (Zhang et al., 2014). Es kann sogar zum irreversiblen Zelluntergang kommen (Hein et al., 1995). Gründe für die MT Zerstörung bei VHF scheinen u. a. Ischämien bzw. Hypoxien zu sein, die auf die Kardiomyozyten wirken. Weiterhin sind ein erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen, mechanische Dehnungen, Connexinmangel und vermehrte Angiotensin II Konzentrationen wahrscheinlich für die Depolymerisation der MT bei VHF mitverantwortlich.

Stathmin ist ein in allen eukaryontischen Zellen vorkommendes Regulatorprotein der MT. Es verhindert deren weiteren Aufbau und aktiviert deren Abbau (Alberts et al., 2007). In vorliegender Arbeit wurde die phosphorylierte Form des Stathmins, das sog. Anti-Stathmin untersucht. Die Phosphorylierung des Proteins führt zu seiner Inaktivierung, sodass die hemmende Wirkung auf die MT entfällt und der MT Aufbau wieder erfolgen kann (Steinmetz, 2007; Uchida und Shumyatsky, 2015). Die Analysen der Anti-Stathmin Verteilung ergaben in beiden Gruppen ähnliche Werte und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Es ist bekannt, dass es bei einigen Erkrankungen zu Dysregulationen von Stathmin mit resultierender GA Fragmentierung, defekten MT und Zelltod kommen kann (Haase und Rabouille, 2015). Deshalb lag die Vermutung nahe, auch bei VHF veränderte Stathminkonzentrationen vorzufinden. Es ist vorstellbar, dass Hypoxie,

oxidativer Stress und ein erhöhter intrazellulärer Calciumeinstrom die Stathminkonzentration bei VHF beeinflussen können.

Neben der GA Fragmentierung und der MT Zerstörung kam es bei VHF zu einer Aktivierung der Cdk 5. Die Kinase kommt v. a. in Neuronen, aber u. a. auch in Myozyten vor (Rosales und Lee, 2006). Die Phosphoproteine p35/p39 aktivieren die Cdk 5 und verankern sie in der Zellmembran (Shukla et al., 2012). Die Kinase kann eine Golgi Fragmentierung induzieren (Sun et al., 2008). Die Cdk 5 befand sich in der SR Gruppe in der Herzmuskelzelle ubiquitär verteilt. In der VHF Gruppe wurde die Kinase eher an der Zellmembran detektiert. Das bedeutet, dass sie bei VHF an p35/39 gebunden und damit aktiver ist als bei SR. Vermutlich triggert die Cdk 5 die bei VHF beobachtete GA Zerstörung. Ursachen für diese Aktivierung können oxidativer Stress, Ischämien bzw. Hypoxien und Calcium Dysregulationen sein, die sich auf den GA sowie auf die MT auswirken und apoptotische Prozesse triggern.

Abschließend wurde das phosphorylierte GM 130 zwischen beiden Gruppen verglichen. GM 130 ist ein cis-Golgi Matrixprotein. Während der Prophase der Mitose wird das Protein zu phospho-GM 130 phosphoryliert. Das bewirkt eine Fragmentierung des GA (Lowe et al., 2000; Sundaramoorthy et al., 2010). Die phosphorylierte Form des GM 130 stellt also einen Marker für einen fragmentierten GA dar. Deshalb wurde vermutet, dass es bei VHF mehr vorkommt bzw. eine andere Lokalisation aufweist, als bei SR. Allerdings konnte dies nicht nachgewiesen werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung des Proteins zwischen den beiden Gruppen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bringen neue Erkenntnisse über die intrazellulären Veränderungen in Form des strukturellen Remodelings bei VHF. Es beeinflusst direkt das Zytoskelett und die Zellorganellen der atrialen Kardiomyozyten. Alle diese Prozesse sind wahrscheinlich sowohl an der Entstehung als auch an der Aufrechterhaltung von VHF beteiligt. Sie können als potenzielle kausale Therapieansätze angesehen werden. Inwieweit die hier festgestellten Veränderungen eine klinische Bedeutung in Form von pharmakologischen Ansatzpunkten haben, bleibt noch zu klären und erfordert weiterführende Untersuchungen. Eventuell bieten sich in Zukunft Möglichkeiten, die strukturellen Veränderungen bei VHF zu limitieren und die Folgen der Erkrankung zu minimieren.

8 Literaturverzeichnis

Abcam® (2015) Vergleich von direkter und indirekter Immunfluoreszenz. <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/vergleich-von-direkter-und-indirekter-immunfluoreszenz>.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007) Chapter 16 The Cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*. New York, USA: Garland Science. 5.Auflage. S.965-1051.

Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen SJ (1985) Experimental evaluation of moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias*. S.265-275.

Allessie M, Ausma J, Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*. 54(2):230-46. doi:10.1016/S0008-6363(02)00258-4.

Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S (2014) The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation, relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circulation Research*. 114(9):1453-68. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303211.

Aouar LMM, Meyerfreud D, Magalhães P, Rodrigues SL, Baldo MP, Brasil Y, Aouar SM, Aouar NA, Mill JG, Campos OF (2013) Relationship between left atrial volume and diastolic dysfunction in 500 brazilian patients. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 101(1):52-58. doi:10.5935/abc.20130109.

Arif A (2012) Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin-dependent kinase Cdk5. *Biochemical Pharmacology*. 84(8):985-93. doi:10.1016/j.bcp.2012.06.027.

Baquero MT, Hanna JA, Neumeister V, Cheng H, Molinaro AM, Harris LN, Rimm DL (2012) Stathmin expression and its relationship to microtubule associated protein tau and outcome in breast cancer. *Cancer*. 118(19):4660-69. doi:10.1002/cncr.27453.

- Belletti B, Baldassarre G (2011) Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 15(11):1249-66. doi:10.1517/14728222.2011.620951.
- Bellouze S, Baillat G, Buttigieg D, Grange P, Rabouille C, Haase G (2016) Stathmin 1/2- triggered microtubule loss mediates golgi fragmentation in mutant SOD1 motor neurons. *Molecular Neurodegeneration*. 11:43. doi:10.1186/s13024-016-0111-6.
- Bexiga MG, Simpson JC (2013) Human diseases associated with form and function of the golgi complex. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(9):18670-81. doi:10.3390/ijms140918670.
- Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S (2003) Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 42(10):1785-92. doi:10.1016/j.jacc.2003.07.014.
- Boldt A, Wetzel U, Lauschke J (2004) Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart*. 90(4):400-405. doi:10.1136/hrt.2003.015347.
- Brandon E, Gao Y, Garcia-Mata R, Alvarez C, Sztul E (2003) Membrane targeting of p115 phosphorylation mutants and their effects on golgi integrity and secretory traffic. *European Journal of Cell Biology*. 82(8):411-20. doi:10.1078/0171-9335-00327.
- Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S (2008) Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovascular Research*. 76(3):442-52. doi:10.1016/j.cardiores.2007.07.013.
- Centuri3n OA, Shimizu A, Isomoto S, Konoe A (2008) Mechanisms for the genesis of paroxysmal atrial fibrillation in the wolff-parkinson-white syndrome: intrinsic atrial muscle vulnerability vs. electrophysiological properties of the accessory pathway. *Europace*. 10(3):294-302. doi:10.1093/europace/eun031.

Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Poüs C (2001) The golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Molecular Biology of the Cell*. 12(7):2047-60. doi: 10.1091/mbc.12.7.2047.

Chang SL, Tai CT, Lin JY, Lo LW, Tuan TC, Udyavar AR, Tsao HM, Hsieh MH, Hu YF, Chiang SJ, Chen YJ, Wong W, Ueng KC, Chen SA (2008) Electrophysiological characteristics and catheter ablation in patients with paroxysmal supraventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 19(4):367-73. doi:10.1111/j.1540-8167.2007.01065.x.

Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S (2014) Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circulation Research*. 114(9):1500-1515. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303772.

Cheon MS, Fountoulakis M, Cairns NJ, Dierssen M, Herkner K, Lubec G (2001) Decreased protein levels of stathmin in adult brains with down syndrome and alzheimer's disease. *Springerverlag Wien, Protein Expression in Down Syndrome Brain*. S.281-88. doi:10.1007/978-3-7091-6262-0_23.

Cunha SR, Hund TJ, Hashemi S, Voigt N, Li N, Wright P, Koval O et al. (2011) Defects in ankyrin-based membrane protein targeting pathways underlie atrial fibrillation. *Circulation*. 124(11):1212-22. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.023986.

Danon A, Zeevi-Levin N, Pinkovich DJ, Michaeli T, Berkovich A, Flugelman M, Eldar YC, Rosen MR, Binah O (2012) Hypoxia causes connexin 43 internalization in neonatal rat ventricular myocytes. *General Physiology and Biophysics*. 29(3):222–33. doi:10.4149/gpb_2010_03_222.

Demestre M, Howard RS, Orrell RW, Pullen AH (2006) Serine proteases purified from sera of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) induce contrasting cytopathology in murine motoneurons to IgG." *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 32(2):141-56. doi:10.1111/j.1365-2990.2006.00712.x.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, European Society of Cardiology (2012) Leitlinien für das Management von Vorhofflimmern. doi:10.1093/eurheartj/ehs253.

- Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of Cdk5. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(10):749-59. doi:10.1038/35096019.
- Dhein S (2006) Role of connexins in atrial fibrillation. *Cardiovascular Gap Junctions. Advances in Cardiology*. 42:161–74. doi:10.1159/000092568.
- Dhein S (2011) Remodeling bei Vorhofflimmern, neue Aspekte zur Medikamentenwirkung. *Stand Der Wissenschaft, Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. (6):379-84. doi:10.1007/s00398-011-0879-1.
- Dhein S, Duerrschmidt N, Scholl A, Boldt A, Schulte JS, Pfannmüller B, Rojas-Gomez D et al. (2008) A new role for extracellular Ca^{2+} in gap-junction remodeling: studies in humans and rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 377(2):125-38. doi:10.1007/s00210-008-0265-z.
- Dhein S, Rothe S, Busch A (2011) Effects of metoprolol therapy on cardiac gap junction remodelling and conduction in human chronic atrial fibrillation. *British Journal of Pharmacology*. 164(2b):607-16. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01460.x.
- Dhein S, Schreiber A, Steinbach S, Apel D, Salameh A, Schlegel F, Kostelka M, Dohmen PM, Mohr FW (2014) Mechanical control of cell biology. Effects of cyclic mechanical stretch on cardiomyocyte cellular organization. *Novel Technologies as Drivers of Progress in Cardiac Biophysics*. 115(2-3):93-102. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.006.
- Doll N, Borger MA, Fabricius A, Stephan S, Gummert J, Mohr FW, Hauss J, Kottkamp H, Hindricks G (2003) Esophageal perforation during left atrial radiofrequency ablation: is the risk too high?. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 125(4):836-42. doi:10.1067/mtc.2003.165.
- Emdin CA, Wong CX, Hsiao AJ, Altman DG, Peters SAE, Woodward M, Odutayo AA (2016) Atrial fibrillation as risk factor for cardiovascular disease and death in women compared with men: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *BMJ*. 532:h7013. doi:10.1136/bmj.h7013.
- Fan J, Hu Z, Zeng L, Lu W, Tang X, Zhang J, Li T (2008) Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 26(6):523-34. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.05.006.

Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (2008) Teil 9: kardiovaskuläre Erkrankungen, Abschnitt 3 Herzrhythmusstörungen, 226 Tachyarrythmien. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH. 17. Auflage, Band 2, S.1757-1764.

Feldmann G, Mishra A, Hong SM, Bisht S, Strock CJ, Ball DW, Goggins M, Maitra A, Nelkin BD (2010) Inhibiting the cyclin-dependent kinase Cdk5 blocks pancreatic cancer formation and progression via suppression of ras-ral signaling. *Cancer Research*. 70(11):4460-69. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1107.

Ferreira JP, Santos M (2015) Heart failure and atrial fibrillation: from basic science to clinical practice. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(2):3133-47. doi:10.3390/ijms16023133.

Fink M, Giles WR, Noble D (2006) Contributions of inwardly rectifying K⁺ currents to repolarization assessed using mathematical models of human ventricular myocytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 364(1842):1207-22. doi:10.1098/rsta.2006.1765.

Fontes MSC, Veen TAB, Bakker JMT, Rijen HVM (2012) Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *The Communicating Junctions, Composition, Structure and Characteristics Part 1*. 1818(8):2020-29. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.039.

Francis R, Xu X, Park H, Wei CJ, Chang S, Chatterjee B, Lo C (2011) Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS ONE*. 6(10):e26379. doi:10.1371/journal.pone.0026379.

Geiger RC, Taylor W, Glucksberg MR, Dean DA (2006) Cyclic stretch-induced reorganization of the cytoskeleton and its role in enhanced gene transfer. *Gene Therapy*. 13(8):725-31. doi:10.1038/sj.gt.3302693.

Gomez-Hurtado N, Knollmann BC (2014) Calcium in atrial fibrillation - pulling the trigger or not?. *The Journal of Clinical Investigation*. 124(11):4684-86. doi:10.1172/JCI77986.

- Gong CX, Iqbal K (2008) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: promising therapeutic target for alzheimer disease. *Current Medicinal Chemistry*. 15(23):2321-28. doi:10.2174/092986708785909111.
- Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, Haan S, Verheyen F, (2009) Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46(3):385-94. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.11.012.
- Guharay F, Sachs F (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 352(7):685-701. doi: 10.1113/jphysiol.1984.sp015317.
- Haase G, Rabouille C (2015) Golgi fragmentation in ALS motor neurons. New mechanisms targeting microtubules, tethers, and transport vesicles. *Frontiers in Neuroscience*. 9:448. doi:10.3389/fnins.2015.00448.
- Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J (1998) Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *The New England Journal of Medicine*. 339(10):659-66. doi:10.1056/NEJM199809033391003.
- Hashimoto-Komatsu A, Hirase T, Asaka M, Node K (2011) Angiotensin II induces microtubule reorganization mediated by a deacetylase SIRT2 in endothelial cells. *Hypertension Research*. 34(8):949-56. doi:10.1038/hr.2011.64.
- Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D (2014) Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circulation Research*. 114(9):1483-99. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302226.
- Hein S, Scheffold T, Schaper J (1995) Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 110(1):89-98. doi:10.1016/S0022-5223(05)80013-3.
- Hicks SW, Machamer CE (2005) Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *The Golgi Complex*. 1744(3):406-14. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.03.002.

- Hirner A, Weise K (2008) Herz und intrathorakale Gefäße, Extrakorporale Zirkulation. *Chirurgie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 2. Auflage. S.772-773.
- Hirtz M (2015) Fluoreszenzmikroskopie. *Thieme RÖMPP*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-06-02696>.
- Hori M, Sato H, Fukunami M, Houki N (1993) Pathophysiology of cytoskeleton and extracellular matrix in failing myocardium. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. 51(5):1191-97.
- Hori M, Sato H, Kitakaze M, Iwai K, Takeda H, Inoue M, Kamada T (1994) Beta-adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca^{2+} overload. *Circulation Research*. 75(2):324-34. doi:10.1161/01.RES.75.2.324.
- Hu JY, Chu ZG, Han J, Dang YM, Yan H, Zhang Q, Liang GP, Huang YS (2009) The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67(2):321-33. doi:10.1007/s00018-009-0187-z.
- Hung KS, Hwang SL, Ling CL, Chen YJ, Lee TH, Liu JK, Howng SL, Wang CH (2005) Calpain inhibitor inhibits p35-p25-Cdk5 activation, decreases tau hyperphosphorylation, and improves neurological function after spinal cord hemisection in rats. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 64(1):15-26. doi:10.1093/jnen/64.1.15.
- Hu Z, Zeng L, Huang Z, Zhang J, Li T (2007) The study of golgi apparatus in alzheimer's disease. *Neurochemical Research*. 32(8):1265-77. doi:10.1007/s11064-007-9302-4.
- Kato T, Iwasaki Y, Nattel S (2012) Connexins and atrial fibrillation: filling in the gaps. *Circulation*. 125(2):203-206. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075432.
- Ke L, Qi XY, Dijkhuis AJ, Chartier D, Nattel S, Henning RH, Kampinga HH, Brundel BJJM (2008) Calpain mediates cardiac troponin degradation and contractile dysfunction in atrial fibrillation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 45(5):685-93. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.08.012.

- Kikukawa K, Fukunaga K, Kato T, Yamaga M, Miyamoto E, Takagi K (2003) Acute changes in the axonal cytoskeleton after mild stretching of the rat brachial plexus. *Journal of Orthopaedic Research*. 21(2):359-64.doi:10.1016/S0736-0266(02)00146-8.
- Kohl P, Bollensdorff C, Garny A (2006) Effects of mechanosensitive ion channels on ventricular electrophysiology: experimental and theoretical models. *Experimental Physiology*. 91(2):307-21. doi:10.1113/expphysiol.2005.031062.
- Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J (2002) Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovascular Research*. 54(2):361-79. doi:10.1016/S0008-6363(02)00273-0.
- Laky D, Parascan L, Candea V (2011) Atrial structural remodeling in patients with atrial chronic fibrillations and in animal models. *Romanian Journal of Morphology& Embryology*. 52(1):95-98.
- Levy JR, Holzbaur ELF (2008) Dynein drives nuclear rotation during forward progression of motile fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 121(Pt19):3187-95. doi:10.1242/jcs.033878.
- Lewalter T (2011) Pathophysiologie, Klinik und Therapieoptionen bei Vorhofflimmern. *Fortbildungstelegramm Pharmazie Forte-pharm*. 5(4):106-127.
- Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation*. 104(21):2608-14. doi:10.1161/hc4601.099402.
- Li Y, Chan PH (1998) Identification of the pro-oncogene stathmin/op18 mRNA in the brain of mitochondrial Mn-superoxide dismutase-deficient mice by a modified differential display PCR. *Molecular Brain Research*. 55(2):277-84. doi:10.1016/S0169-328X(98)00008-4.
- Lowe M, Gonatas NK, Warren G (2000) The mitotic phosphorylation cycle of the cis-golgi matrix protein GM130. *The Journal of Cell Biology*. 149(2):341-56. doi: 10.1083/jcb.149.2.341.

Luo MH, Li YS, Yang KP (2007) Fibrosis of collagen I and remodeling of connexin 43 in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Cardiology*. 107(4):248-53. doi:10.1159/000095501.

Martens J (2003) Korrelationsanalyse. *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*. Oldenbourg:R. Oldenbourg Verlag München Wien.2.Auflage.S.183-190.

Melby SJ, Gaynor SL, Lubahn JG, Lee AM, Rahgozar P, Caruthers SD, Williams TA, Schuessler RB, Damiano RJJr. (2006) Efficacy and safety of right and left atrial ablations on the beating heart with irrigated bipolar radiofrequency energy: a long-term animal study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 132(4):853-60. doi:10.1016/j.jtcvs.2006.05.048.

Meng XL, Su D, Wang L, Gao Y, Hu YJ, Yang HJ, Xie SN (2012) Low expression of stathmin in tumor predicts high response to neoadjuvant chemotherapy with docetaxel-containing regimens in locally advanced breast cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 16(7):689-94. doi:10.1089/gtmb.2011.0298.

Michela P, Velia V, Aldo P, Ada P (2015) Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology*. 768:71-76. doi:10.1016/j.ejphar.2015.10.030.

Miyauchi Y, Zhou S, Okuyama Y, Miyauchi M, Hayashi H, Hamabe A, Fishbein MC, (2003) Altered atrial electrical restitution and heterogeneous sympathetic hyperinnervation in hearts with chronic left ventricular myocardial infarction: implications for atrial fibrillation. *Circulation*. 108(3):360-66. doi:10.1161/01.CIR.0000080327.32573.7C.

Moe GK, Abildskov JA (1959) Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American Heart Journal*. 58(1):59-70. doi:10.1016/0002-8703(59)90274-1.

Mohr FW, Fabricius AM, Falk V, Autschbach R, Doll N, von Oppell U, Diegeler A, Kottkamp H, Hindricks G (2002) Curative treatment of atrial fibrillation with intraoperative radiofrequency ablation: short-term and midterm results. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 123(5):919-27. doi:10.1067/mtc.2002.120730.

Mulisch M, Welsch U (2010) Mikroskopische Verfahren. *Romeis Mikroskopische Technik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 18.Auflage. S.1-38.

Nakamura N (2010) Emerging new roles of GM130, a cis-golgi matrix protein, in higher order cell functions. *Journal of Pharmacological Sciences*. 112(3):255-64. doi:10.1254/jphs.09R03CR.

Nattel S, Harada M (2014) Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*. 63(22):2335-45. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.555.

Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schöndube FA, Hasenfuss G, Maier LS (2010) CaMKII-dependent diastolic SR Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circulation Research*. 106(6):1134-44. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.203836.

Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Masroor S (2009) Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 6(4):454-60. doi:10.1016/j.hrthm.2009.01.010.

Novo G, Guttilla D, Fazio G, Cooper D, Novo S (2008) The role of the renin-angiotensin system in atrial fibrillation and the therapeutic effects of ACE-Is and ARBS." *British Journal of Clinical Pharmacology*. 66(3):345-51. doi: 10.1111/j.1365-2125.2008.03234.x.

Ogi H, Nakano Y, Niida S, Dote K, Hirai Y, Suenari K, Tonouchi Y et al. (2010) Is structural remodeling of fibrillated atria the consequence of tissue hypoxia? *Circulation Journal*. 74(9):1815-21. doi:10.1253/circj.CJ-09-0969.

Ohkawa N, Fujitani K, Tokunaga E, Furuya S, Inokuchi K (2007) The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells. *Journal of Cell Science*. 120(8):1447-56. doi:10.1242/jcs.001461.

Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JMB, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J (2005) Ionic determinants of functional reentry in a 2D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophysical Journal*. 88(6):3806-21.

doi:10.1529/biophysj.105.060459.

Papula, L (2008) Korrelation und Regression. *Mathematik Für Ingenieure Und Naturwissenschaftler*. Wiesbaden:Vieweg+Teubner. 5.Auflage,3.Band. S.614-626.

Parker KK, Taylor LK, Atkinson B, Hansen DE, Wikswo JP (2001) The effects of tubulin-binding agents on stretch-induced ventricular arrhythmias. *European Journal of Pharmacology*. 417(1-2):131-40. doi:10.1016/S0014-2999(01)00856-1.

Peterson DW, Ando DM, Taketa DA, Zhou H, Dahlquist FW, Lew J (2010) No difference in kinetics of tau or histone phosphorylation by Cdk5/p25 versus Cdk5/p35 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(7):2884-89. doi:10.1073/pnas.0912718107.

Poeggel G (2009) Allgemeine Zellbiologie. *Kurzlehrbuch Biologie*. Stuttgart: Thieme. 2.Auflage. S.26-39.

Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie R, Dhein S (2001) Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *Journal of the American College of Cardiology*. 38(3):883-91. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01443-7.

Prasad SM, Maniar HS, Diodato MD, Schuessler RB, Damiano Jr. RJ (2003) Physiological consequences of bipolar radiofrequency energy on the atria and pulmonary veins: a chronic animal study. *The Annals of Thoracic Surgery*. 76(3):836-42. doi:10.1016/S0003-4975(03)00716-1.

Qi GJ, Chen Q, Chen LJ, Shu Y, Bu LL, Shao XY, Zhang P, Jiao FJ, Shi J, Tian B (2016) Phosphorylation of connexin 43 by Cdk5 modulates neuronal migration during embryonic brain development. *Molecular Neurobiology*. 53(5):2969-82. doi:10.1007/s12035-015-9190-6.

Ramlawi B, Abu Saleh WK (2015) Surgical ablation of atrial fibrillation. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 11(2):104-8. doi:10.14797/mdcj-11-2-104.

Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, deLapeyrière O, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*.

35(6):1067-83. doi:10.1016/S0896-6273(02)00905-4.

Rashidian J, Iyirhiaro G, Aleyasin H, Rios M, Vincent I, Callaghan S, Bland RJ, Slack RS, During MJ, Park DS (2005) Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(39):14080-85. doi:10.1073/pnas.0500099102.

Reed A, Kohl P, Peyronnet R (2014) Molecular candidates for cardiac stretch-activated ion channels. *Global Cardiology Science & Practice*. 2014(2):9-25. doi:10.5339/gcsp.2014.19.

Robison P, Caporizzo MA, Ahmadzadeh H, Bogush AI, Chen CY, Margulies KB, Shenoy VB, Prosser BL (2016) Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science*. 352(6284). doi:10.1126/science.aaf0659.

Röcken C, Peters B, Juenemann G, Saeger W, Klein HU, Huth C, Roessner A, Goette A (2002) Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 106(16):2091-97. doi:10.1161/01.CIR.0000034511.06350.DF.

Rojas P P, Surroca A, Orellana A, Wolff D (2000) Kinetic characterization of calcium uptake by the rat liver golgi apparatus. *Cell Biology International*. 24(4):229-33. doi:10.1006/cbir.2000.0496.

Rosales JL, Lee KY (2006) Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. *BioEssays*. 28(10):1023-34. doi:10.1002/bies.20473.

Ruknudin A, Sachs F, Bustamante JO (1993) Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 264(3):H960-72.

Salameh A, Wustmann A, Karl S, Blanke K, Apel D, Rojas-Gomez D, Franke H, Mohr FW, Janousek J, Dhein S (2010) Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circulation Research*. 106(10):1592-1602. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.214429.

Sarantitis I, Papanastasopoulos P, Manousi M, Baikoussis N, Apostolakis E (2012) The cytoskeleton of the cardiac muscle cell. *Hellenic Journal of Cardiology*. 53(5):367-79.

Sato T, Zipes DP (1996) Unequal atrial stretch in dogs increases dispersion of refractoriness conducive to developing atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 7(9):833-42. doi:10.1111/j.1540-8167.1996.tb00596.x.

Schliwa M, Euteneuer U, Bulinski JC, Izant JG (1981) Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(2):1037-41.

Schnabel R (2012) Vorhofflimmern und Schlaganfallrisiko in der Allgemeinbevölkerung. 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V., Presstext DGK 04/2012.

Schotten U, de Haan S, Neuberger HR, Eijssbouts S, Blaauw Y, Tieleman R, Allessie M (2004) Loss of atrial contractility is primary cause of atrial dilatation during first days of atrial fibrillation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 287(5):H2324-31. doi:10.1152/ajpheart.00581.2004.

Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A (2011) Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiological Reviews*. 91(1):265-325. doi:10.1152/physrev.00031.2009.

Schröckel JW (2012) Pulmonalvenen-Isolation zur Behandlung von Vorhofflimmern, die Endoskopie-gesteuerte Laserballon-Ablation. *Forum Sanitas- das informative Medizinmagazin*. (2):4-6.

Severino A, Narducci ML, Pedicino D, Pazzano V, Giglio AF, Biasucci LM, Liuzzo G et al. (2012) Reversible atrial gap junction remodeling during hypoxia/reoxygenation and ischemia: a possible arrhythmogenic substrate for atrial fibrillation. *General Physiology and Biophysics*. 31(4):439-48. doi:10.4149/gpb_2012_047.

Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothley S (2008) Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovascular Research*.

80(1):9-19. doi:10.1093/cvr/cvn133.

Shah K, Lahiri DK (2016) A tale of the good and bad: remodeling of the microtubule network in the brain by Cdk5. *Molecular Neurobiology*. 1-14. doi:10.1007/s12035-016-9792-7.

Shaw RM, Colecraft HM (2013) L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*. 98(2):177-86. doi:10.1093/cvr/cvt021.

Shukla V, Mishra SK, Pant HC (2011) Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2011:572-634. doi:10.1155/2011/572634.

Shukla V, Skuntz S, Pant HC (2012) Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing alzheimer's disease. *Archives of Medical Research*. 43(8):655-62. doi:10.1016/j.arcmed.2012.10.015.

Smith S, Curran J, Hund TJ, Mohler PJ (2012) Defects in cytoskeletal signaling pathways, arrhythmia, and sudden cardiac death. *Frontiers in Physiology*. 3:122. doi:10.3389/fphys.2012.00122.

Sokabe M, Sachs F, Jing ZQ (1991) Quantitative video microscopy of patch clamped membranes stress, strain, capacitance, and stretch channel activation. *Biophysical Journal*. 59(3):722-28. doi:10.1016/S0006-3495(91)82285-8.

Steinmetz MO (2007) Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *Structural Analysis of Supramolecular Assemblies by Hybrid Methods*. 158(2):137-47. doi:10.1016/j.jsb.2006.07.018.

Strey CW, Spellman D, Stieber A, Gonatas JO, Wang X, Lambris JD, Gonatas NK (2004) Dysregulation of stathmin, a microtubule-destabilizing protein, and up-regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Pathology*. 165(5):1701-18. doi:10.1016/S0002-9440(10)63426-8.

Strocchi P, Pession A, Dozza B (2003) Up-regulation of Cdk5/p35 by oxidative stress in human neuroblastoma IMR-32 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 88(4):758-65. doi:10.1002/jcb.10391.

Sundaramoorthy S, Goh JBG, Rafee S, Murata-Hori M (2010) Mitotic golgi vesiculation involves mechanisms independent of Ser25 phosphorylation of GM130. *Cell Cycle*. 9(15):3172-77. doi:10.4161/cc.9.15.12522.

Sun KH, De Pablo Y, Vincent F, Johnson EO, Chavers AK, Shah K (2008) Novel genetic tools reveal Cdk 5's major role in golgi fragmentation in alzheimer's disease. *Molecular Biology of the Cell*. 19(7):3052-69. doi:10.1091/mbc.E07-11-1106.

Tan X, Chen Y, Li J, Li X, Miao Z, Xin N, Zhu J, Ge W, Feng Y, Xu X (2015) The inhibition of Cdk5 activity after hypoxia/ischemia injury reduces infarct size and promotes functional recovery in neonatal rats. *Neuroscience*. 290:552-60. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.054.

Thyberg J, Moskalewski S (1999) Role of microtubules in the organization of the golgi complex. *Experimental Cell Research*. 246(2):263-79. doi:10.1006/excr.1998.4326.

Trappe HJ (2012) Atrial fibrillation: established and innovative methods of evaluation and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 109(1-2):1-7. doi:10.3238/arztebl.2012.0001.

Trappe HJ, Schuster HP (2011) EKG-Befunde, Lektion 25 Vorhofflimmern und Vorhofflattern. *EKG-Kurs für Isabel*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 6.Auflage. S.93-94.

Uchida S, Shumyatsky GP (2015) Deceivingly dynamic: learning-dependent changes in stathmin and microtubules. *Neurobiology of Learning and Memory*. 124:52-61. doi:10.1016/j.nlm.2015.07.011.

Verheule S, Wilson EE, Arora R, Engle SK, Scott LR, Olgin JE (2002) Tissue structure and connexin expression of canine pulmonary veins. *Cardiovascular Research*. 55(4):727-38. doi:10.1016/S0008-6363(02)00490-X.

Vinogradova T, Paul R, Grimaldi AD, Loncarek J, Miller PM, Yampolsky D, Magidson V, Khodjakov A, Mogilner A, Kaverina I (2012) Concerted effort of centrosomal and golgi-derived microtubules is required for proper golgi complex assembly but not for maintenance. *Molecular Biology of the Cell*. 23(5):820-33.

doi:10.1091/mbc.E11-06-0550.

Walters TE, Lee G, Spence S, Larobina M, Atkinson V, Antippa P, Goldblatt J et al. (2014) Acute atrial stretch results in conduction slowing and complex signals at the pulmonary vein to left atrial junction: insights into the mechanism of pulmonary vein arrhythmogenesis. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 7(6):1189-97. doi:10.1161/CIRCEP.114.001894.

Wen HL, Lin YT, Ting CH, Lin-Chao S, Li H, Hsieh-Li HM (2010) Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*. 19(9):1766-78. doi:10.1093/hmg/ddq058.

Wetzel U, Boldt A, Lauschke J, Weigl J, Schirdewahn P, Dorszewski A, Doll N, Hindricks G, Dhein S, Kottkamp H (2005) Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies. *Heart*. 91(2):166-70. doi:10.1136/hrt.2003.024216.

White CW, Kerber RE, Weiss HR, Marcus ML (1982) The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships. *Circulation Research*. 51(2):205-15. doi:10.1161/01.RES.51.2.205.

Wijesurendra RS, Casadei B (2015) Atrial fibrillation: effects beyond the atrium? *Cardiovascular Research*. 105(3):238-47. doi:10.1093/cvr/cvv001.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation*. 92(7):1954-68. doi:10.1161/01.CIR.92.7.1954.

Workman AJ, Rankin AC (2010) Do hypoxaemia or hypercapnoea predispose to atrial fibrillation in breathing disorders, and if so, how? *Heart Rhythm: The Official Journal of the Heart Rhythm Society*. 7(9):1271-72. doi:10.1016/j.hrthm.2010.04.004.

Xiao J, Zhang H, Liang D, Liu Y, Zhao H, Li J, Peng L, Chen YH (2010) Taxol, a microtubule stabilizer, prevents atrial fibrillation in in vitro atrial fibrillation models using rabbit hearts. *Medical Science Monitor*. 16(11):BR353-60.

Xue Y, Zhao R, Du SH, Zhao D, Li DR, Xu JT, Xie XL, Wang Q (2016) Decreased mRNA levels of cardiac Cx43 and ZO1 in sudden cardiac death related to coronary atherosclerosis: a pilot study. *International Journal of Legal Medicine*. 130(4):915-22. doi:10.1007/s00414-016-1353-0.

Yang W, Storrie B (1998) Scattered golgi elements during microtubule disruption are initially enriched in trans-golgi proteins. *Molecular Biology of the Cell*. 9(1):191-207. doi: 10.1091/mbc.9.1.191.

Yeh HI, Hou SH, Hu HR, Lee YN, Li JY, Dupont E, Coppen SR, Ko YS, Severs NJ, Tsai CH (2002) Alteration of gap junctions and connexins in the right atrial appendage during cardiopulmonary bypass. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 124(6):1106-12. doi:10.1067/mtc.2002.124993.

Yoshida T, Kamiya T, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T (1999) Low cytoplasmic pH causes fragmentation and dispersal of the golgi apparatus in human hepatoma cells. *International Journal of Experimental Pathology*. 80(1):51-57. doi:10.1046/j.1365-2613.1999.00097.x.

Youm JB, Han J, Kim N, Zhang YH, Kim E, Leem CH, Kim SJ (2005) Role of stretch-activated channels in the heart: action potential and Ca^{2+} transients. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*.

Yutao X, Geru W, Xiaojun B, Tao G, Aiqun M (2006) Mechanical stretch-induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes is mediated by $\beta 1$ -integrin-microtubule signaling pathways. *European Journal of Heart Failure*. 8(1):16-22. doi:10.1016/j.ejheart.2005.05.014.

Zhang D, Wu CT, Qi XY, Meijering RAM, Hoogstra-Berends F, Tadevosyan A, Cubukcuoglu Deniz G et al. (2014) Activation of histone deacetylase-6 induces contractile dysfunction through derailment of α -tubulin proteostasis in experimental and human atrial fibrillation. *Circulation*. 129(3):346-58. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005300.

Zhang YH, Youm JB, Sung HK, Lee SH, Ryu SY, Lee SH, Ho WK, Earm YE (2000) Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes. *The Journal of Physiology*. 523(3):607-19. doi:10.1111/j.1469-

7793.2000.00607.x.

Zhu X, Kaverina I (2013) Golgi as an MTOC: making microtubules for its own good. *Histochemistry and Cell Biology*. 140(3):361-67. doi:10.1007/s00418-013-1119-4.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 schematische Darstellung der Pathophysiologie bei VHF sowie der EKG-Veränderungen (Trappe und Schuster, 2011), mit Genehmigung des Thieme Verlags	2
Abbildung 1-2 schematische Darstellung einer Kardiomyozyte mit dem Golgi-Apparat und der Mikrotubuli (Shaw und Colecraft, 2013), mit Genehmigung des Verlags "Oxford University Press"	11
Abbildung 1-3 schematische Darstellung der Cdk 5 (Dhavan und Tsai, 2001), mit Genehmigung des Verlags "Nature Publishing Group"	15
Abbildung 4-1 Prinzip einer Herz-Lungen-Maschine (Hirner und Weise, 2008), mit Genehmigung des Thieme Verlags	25
Abbildung 4-2 Prinzip der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (abcam®, 2015), mit Genehmigung von abcam®	27
Abbildung 4-3 Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes (Hirtz, 2015), mit Genehmigung des Thieme Verlags	29
Abbildung 4-4 Auswertung Immunfluoreszenz Anti-GM 130 und α -Tubulin	32
Abbildung 4-5 Auswertung Immunfluoreszenz Anti-Stathmin und α -Tubulin	33
Abbildung 4-6 Auswertung Immunfluoreszenz Cdk 5 und phospho-GM 130	34
Abbildung 5-1 Darstellung von Anti-GM 130 bei SR und VHF	38
Abbildung 5-2 Darstellung von α -Tubulin bei SR und VHF	44
Abbildung 5-3 Darstellung von Anti-Stathmin bei SR und VHF	46
Abbildung 5-4 Darstellung von Cdk 5 und phospho-GM 130 bei SR und VHF	48
Abbildung 5-5 3D-Darstellung von Z-Stack Bildern für die Gruppen SR und VHF50	
Abbildung 6-1 schematische Darstellung der Connexine (grün) in atrialen Myozyten (Kato et al., 2012), mit Genehmigung des Verlags "Wolters Kluwer Health, Inc."	80

Abbildung 6-2 schematische Darstellung der Verbindung zwischen Zytoskelett und einer membrannahen Zellorganelle über multiple Proteine (Alberts et al., 2007), mit Genehmigung des Verlags "Garland Science-Books"	85
Abbildung 6-3 Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse bei VHF	97

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Pathophysiologie des VHF	10
Tabelle 4-1 Patientencharakteristika	24
Tabelle 4-2 Programm des Einbettautomaten	26
Tabelle 4-3 verwendete Antikörper und ihre Verdünnung	28
Tabelle 4-4 Einteilung für das Bestimmtheitsmaß R^2 (Martens, 2003)	36
Tabelle 5-1 Zusammenfassung des Bestimmtheitsmaßes R^2 sowie des p-Wertes für die linearen Korrelationen zwischen den histologischen Ergebnissen sowie der EF und dem Diameter des linken Vorhofes	52
Tabelle 5-2 Zusammenfassung der Ergebnisse mit Mittelwerten, Standardfehler, Dynamik und p-Wert	69
Tabelle 5-3 Zusammenfassung der Korrelationsfunktionen, des Bestimmtheitsmaßes R^2 sowie des p-Wertes für die linearen Korrelationen der histologischen Ergebnisse	70

11 Diagrammverzeichnis

Diagramm 5-1 Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 im rechten und linken Atrium der SR Gruppe	39
Diagramm 5-2 Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 für SR und VHF	39
Diagramm 5-3 Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente im rechten und linken Atrium für SR	40
Diagramm 5-4 Absolute Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente bei SR und VHF .	41
Diagramm 5-5 Absolute Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente bei SR und VHF in Form von Boxplots.....	41
Diagramm 5-6 Größe der Golgi-Apparat Fragmente pro komplette Fläche lateral + polar im rechten und linken Atrium für SR	42
Diagramm 5-7 Größe der Golgi-Apparat Fragmente pro komplette Fläche lateral + polar für SR und VHF	43
Diagramm 5-8 Größe der Golgi-Apparat Fragmente pro komplette Fläche lateral + polar für SR und VHF in Form von Boxplots	43
Diagramm 5-9 Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ im rechten und linken Atrium für SR	45
Diagramm 5-10 Anzahl der Tubulinfilamente/Zelle $\geq 10 \mu\text{m}$ für SR und VHF	45
Diagramm 5-11 Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin für SR und VHF	47
Diagramm 5-12 Verhältnis des Umfangs der membranären Cdk 5 in μm zum Umfang der gesamten Zelle in μm im rechten und linken Atrium für SR.....	48
Diagramm 5-13 Verhältnis des Umfangs der membranären Cdk 5 in μm zum Umfang der gesamten Zelle in μm für SR und VHF	49
Diagramm 5-14 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130	53

Diagramm 5-15 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130	54
Diagramm 5-16 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130	55
Diagramm 5-17 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130	55
Diagramm 5-18 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente.....	56
Diagramm 5-19 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente.....	57
Diagramm 5-20 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente.....	57
Diagramm 5-21 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Anzahl der Golgi-Apparat Fragmente.....	58
Diagramm 5-22 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Ratio Größe der Golgi-Apparat Fragmente/komplette definierte Fläche in %.....	59
Diagramm 5-23 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Ratio Größe der Golgi-Apparat Fragmente/komplette definierte Fläche in %.....	59
Diagramm 5-24 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Größe der Golgi-Apparat Fragmente	60
Diagramm 5-25 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Größe der Golgi-Apparat Fragmente	61
Diagramm 5-26 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$	62
Diagramm 5-27 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$	62

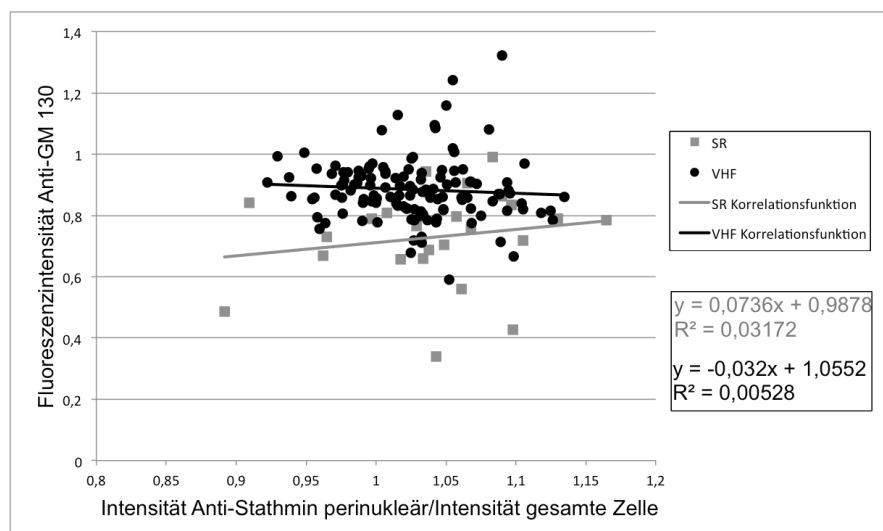
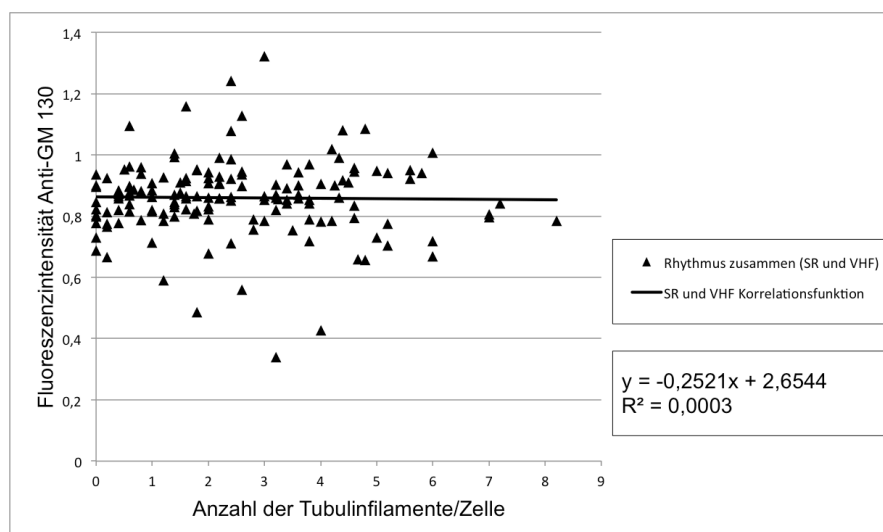
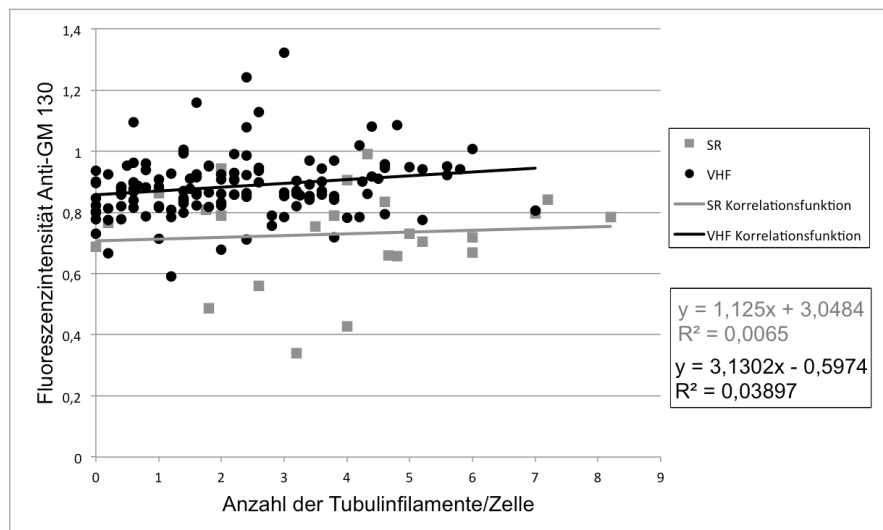
Diagramm 5-28 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$	63
Diagramm 5-29 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm Anzahl der Tubulinfilamente $\geq 10 \mu\text{m}$	63
Diagramm 5-30 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin	64
Diagramm 5-31 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin	65
Diagramm 5-32 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin	65
Diagramm 5-33 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und der Fluoreszenzintensität von Anti-Stathmin	66
Diagramm 5-34 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und Cdk 5	67
Diagramm 5-35 lineare Korrelation zwischen der Ejektionsfraktion EF in % und Cdk 5	67
Diagramm 5-36 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und Cdk 5	68
Diagramm 5-37 lineare Korrelation zwischen dem Diameter des linken Vorhofs in mm und Cdk 5	68

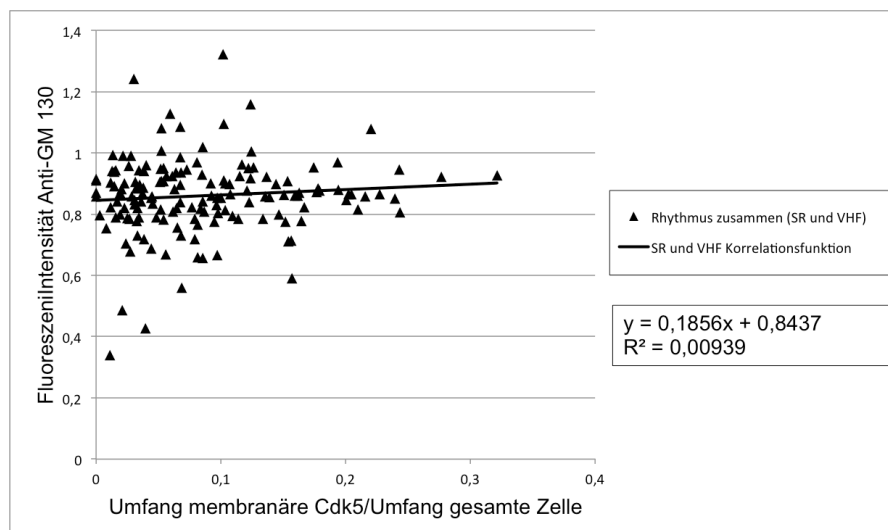
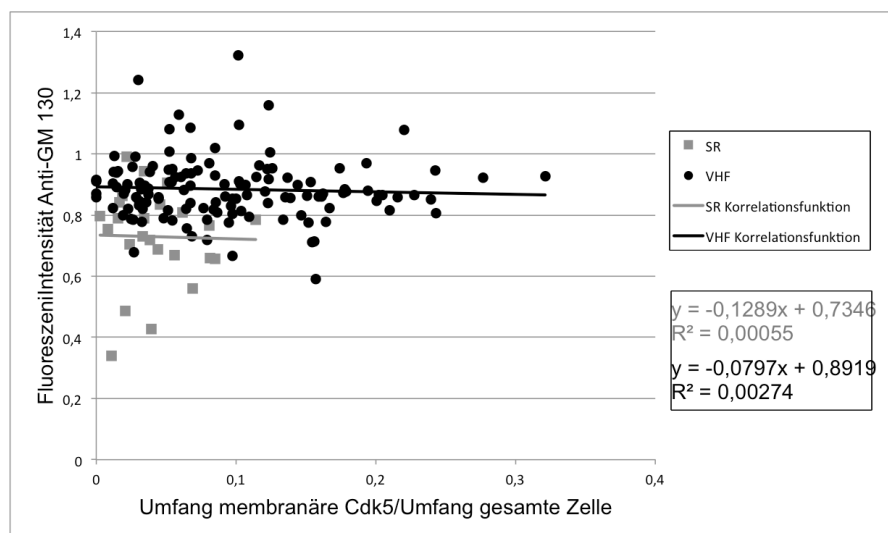
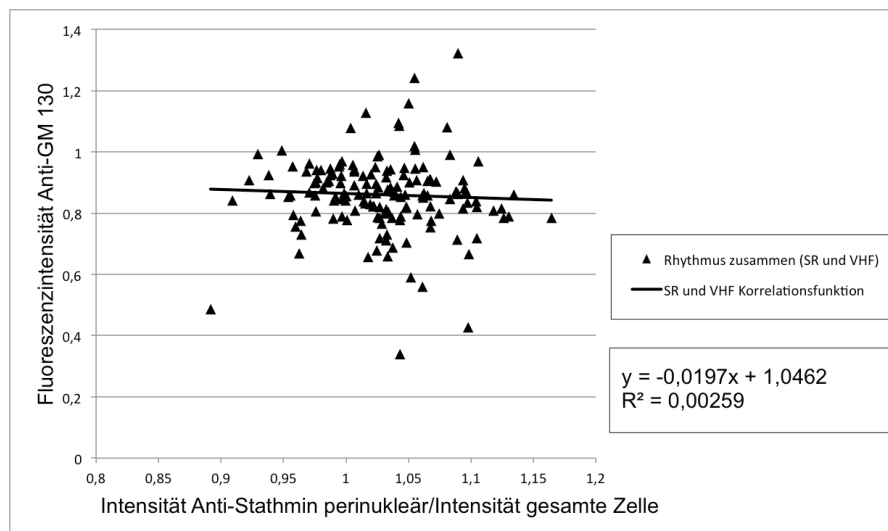
12 Anlagen

Anlagenverzeichnis

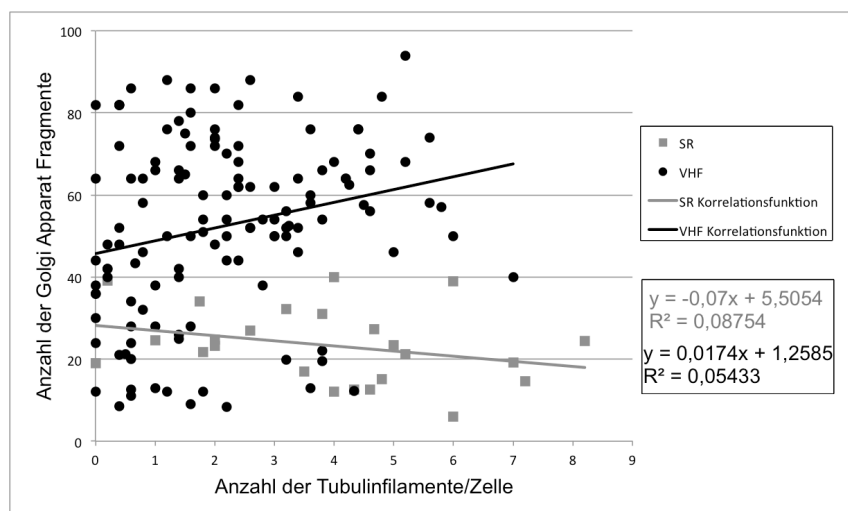
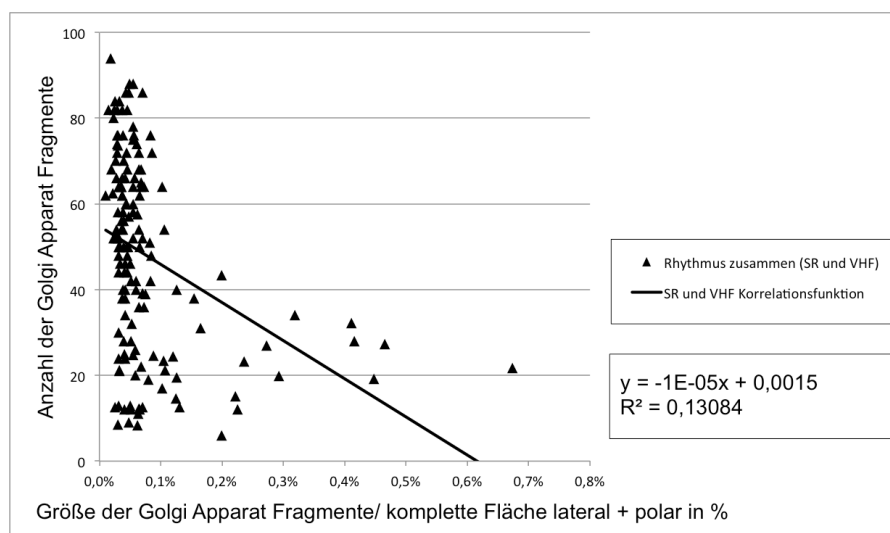
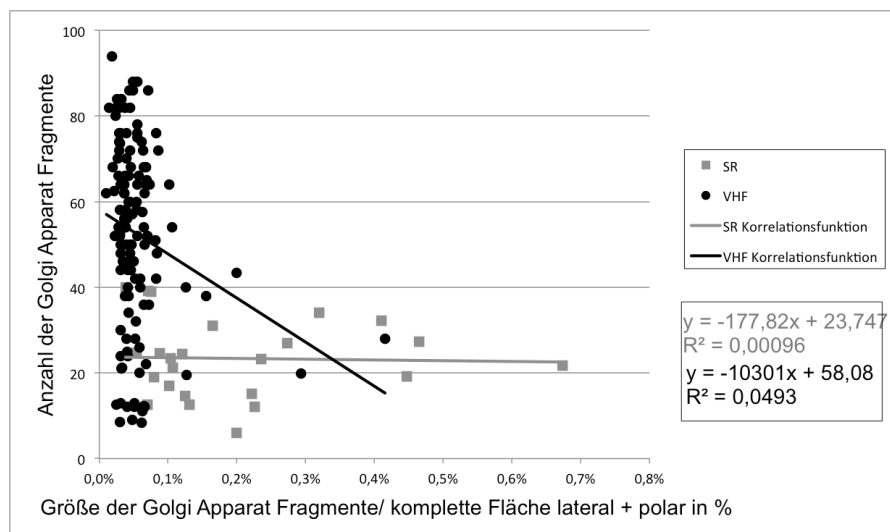
Anlage A 1	lineare Korrelationen zwischen der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 und den Parametern Anzahl der Tubulinfilamente, Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5.....	128
Anlage A 2	lineare Korrelationen zwischen der Anzahl der GA Fragmente und den Parametern Größe der GA Fragmente, Anzahl der Tubulinfilamente, Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5	130
Anlage A 3	lineare Korrelationen zwischen der Größe der GA Fragmente und den Parametern Anzahl der Tubulinfilamente, Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5	133
Anlage A 4	lineare Korrelationen zwischen der der Anzahl der Tubulinfilamente und den Parametern Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5...	135
Anlage A 5	lineare Korrelationen zwischen der Intensität von Anti-Stathmin und dem Umfang der Cdk 5	137

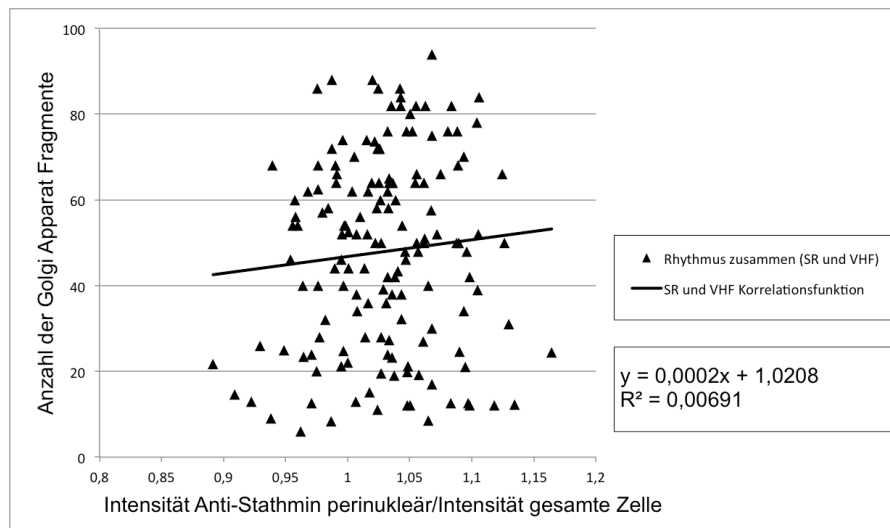
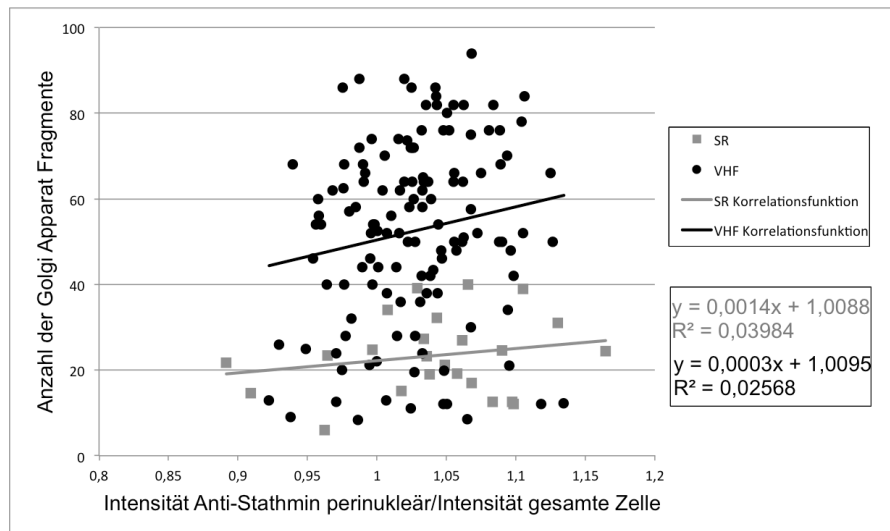
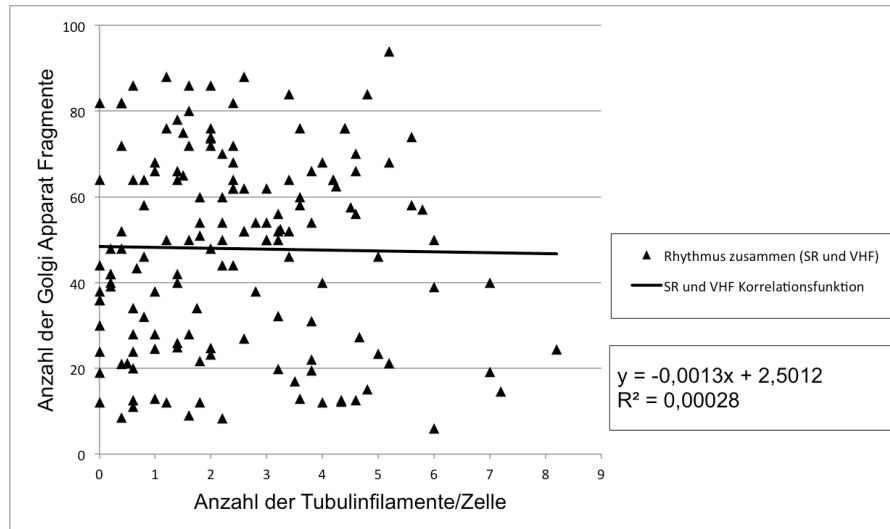
Anlage A 1 lineare Korrelationen zwischen der Fluoreszenzintensität von Anti-GM 130 und den Parametern Anzahl der Tubulinfilamente, Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5

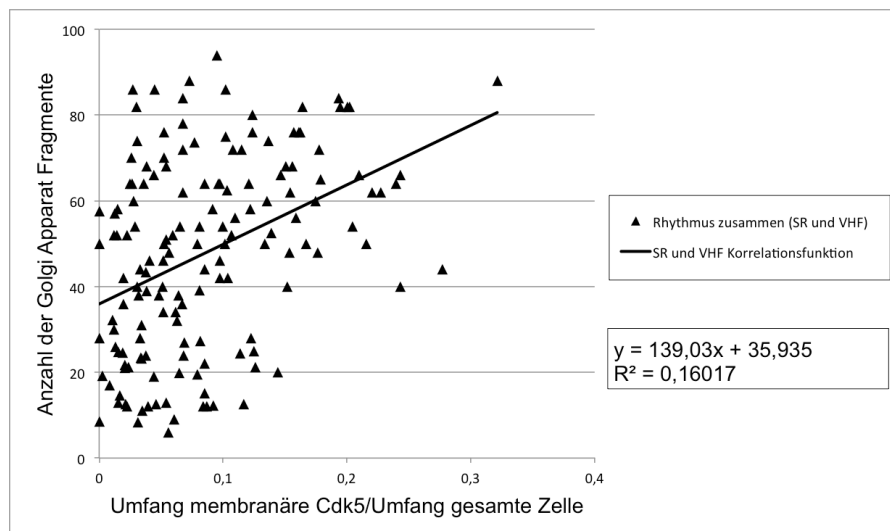
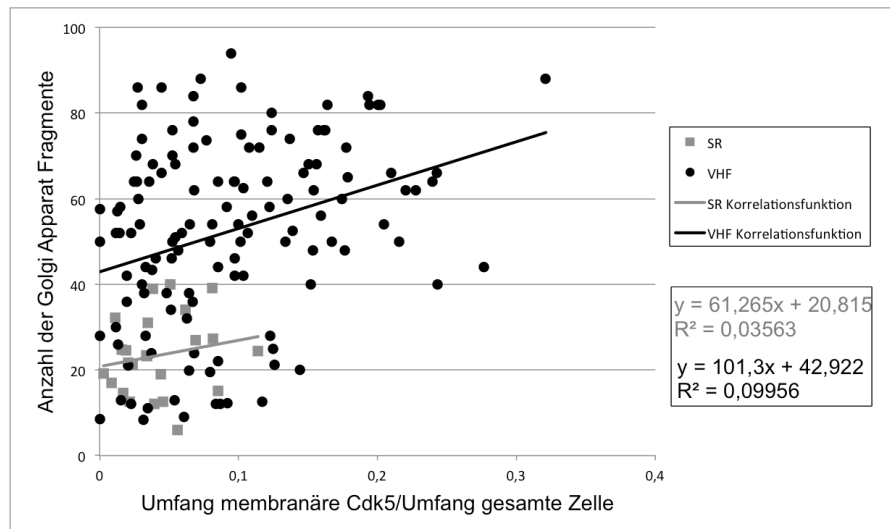




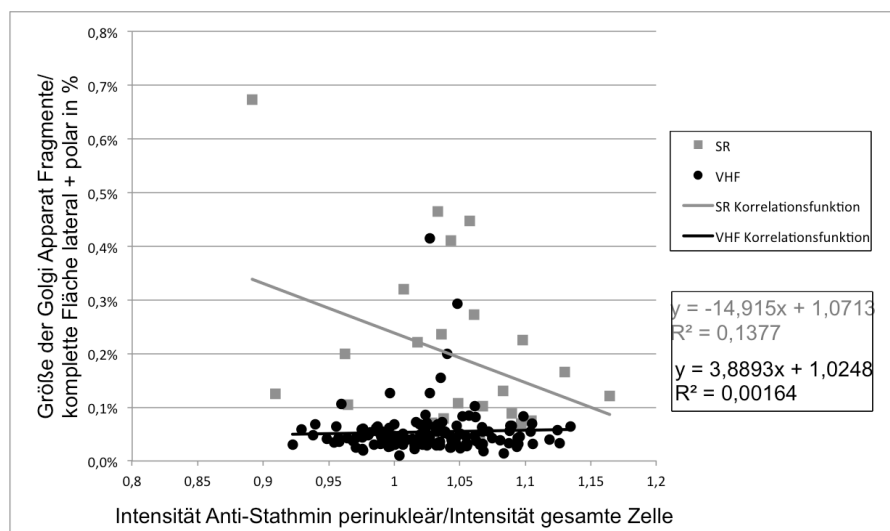
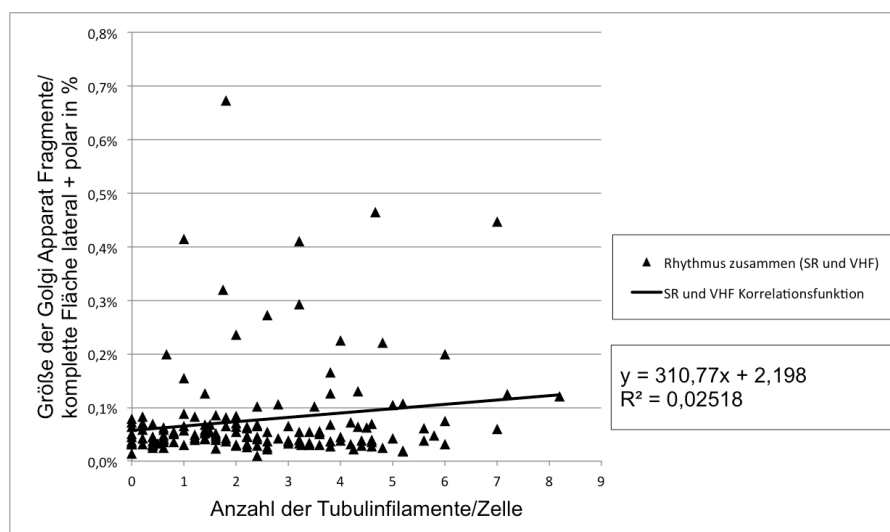
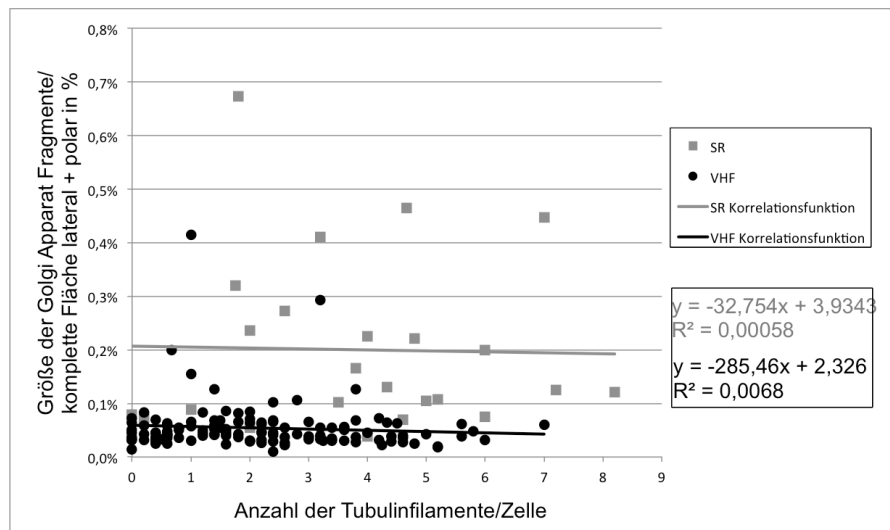
Anlage A 2 lineare Korrelationen zwischen der Anzahl der GA Fragmente und den Parametern Größe der GA Fragmente, Anzahl der Tubulinfilamente, Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5

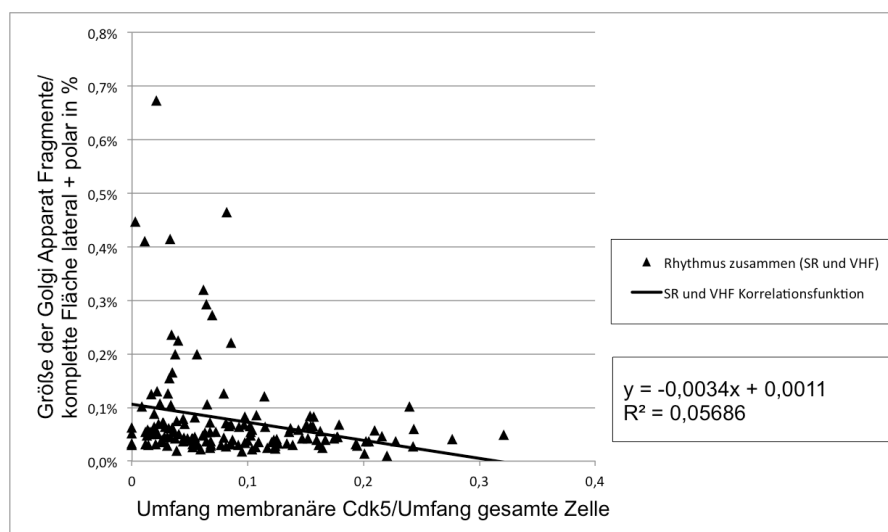
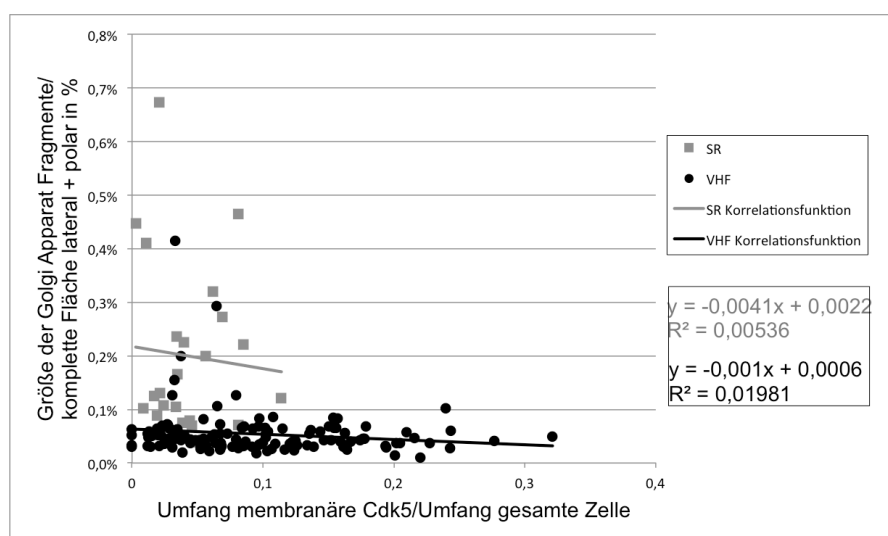
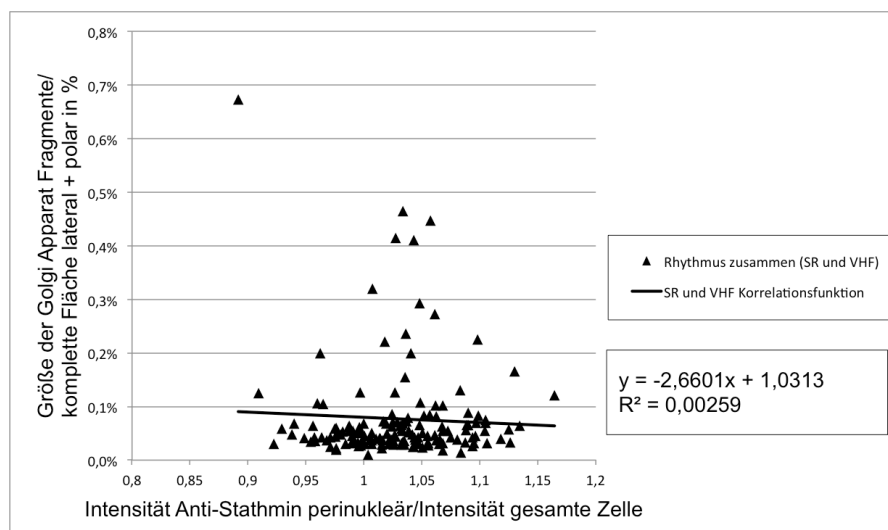




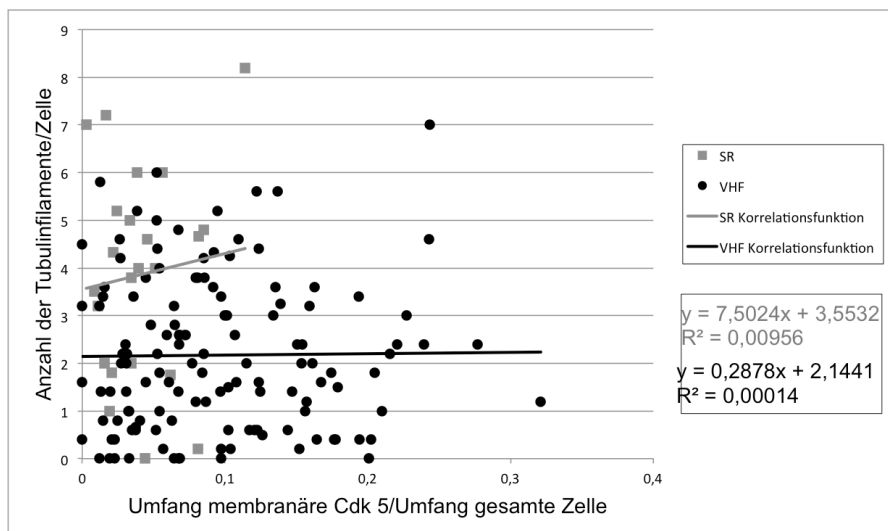
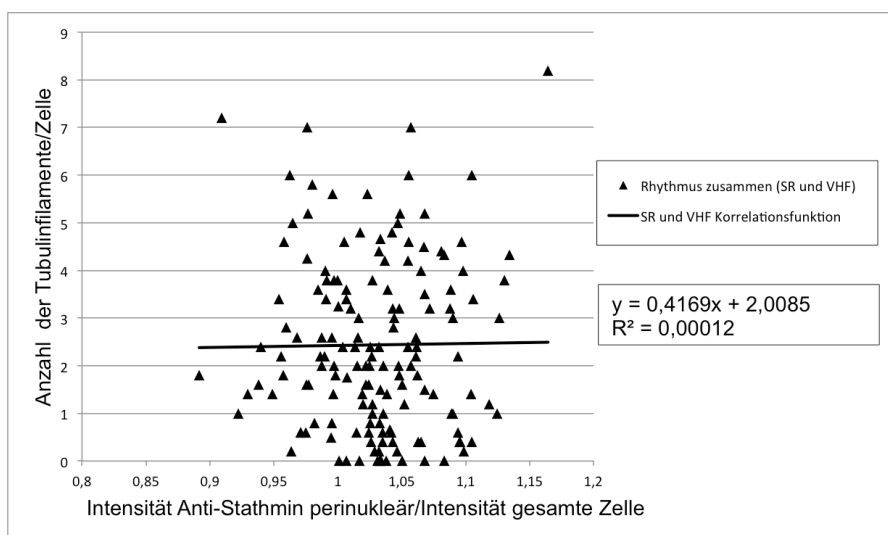
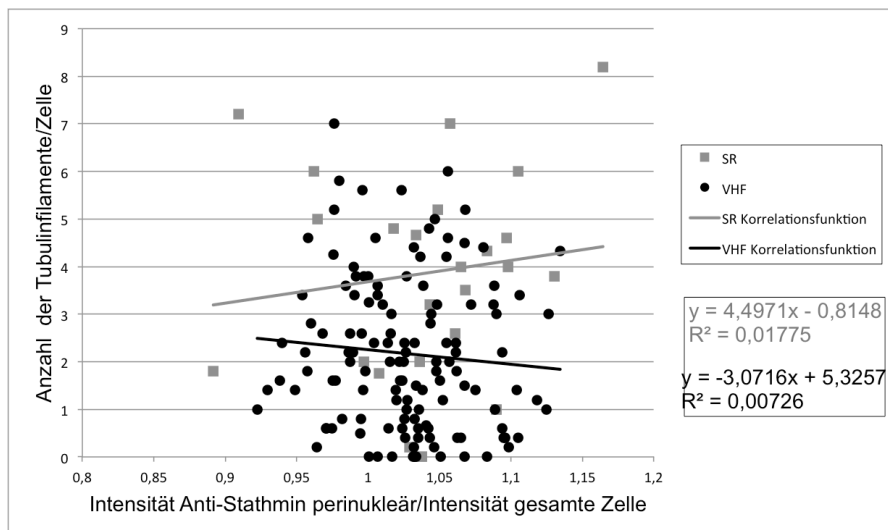


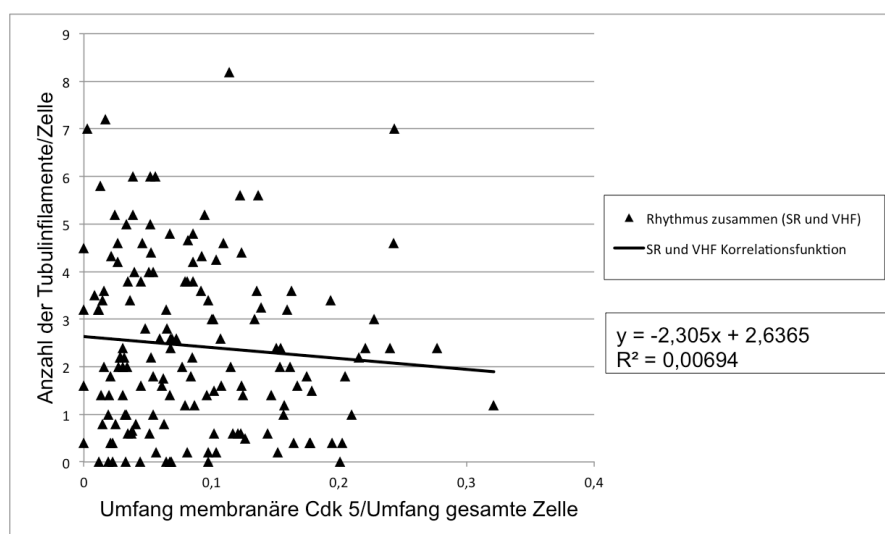
Anlage A 3 lineare Korrelationen zwischen der Größe der GA Fragmente und den Parametern Anzahl der Tubulinfilamente, Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5



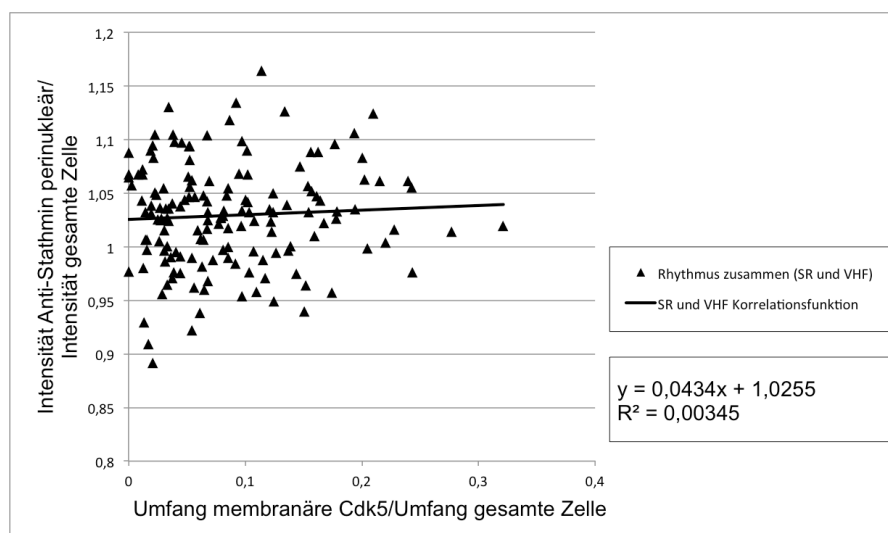
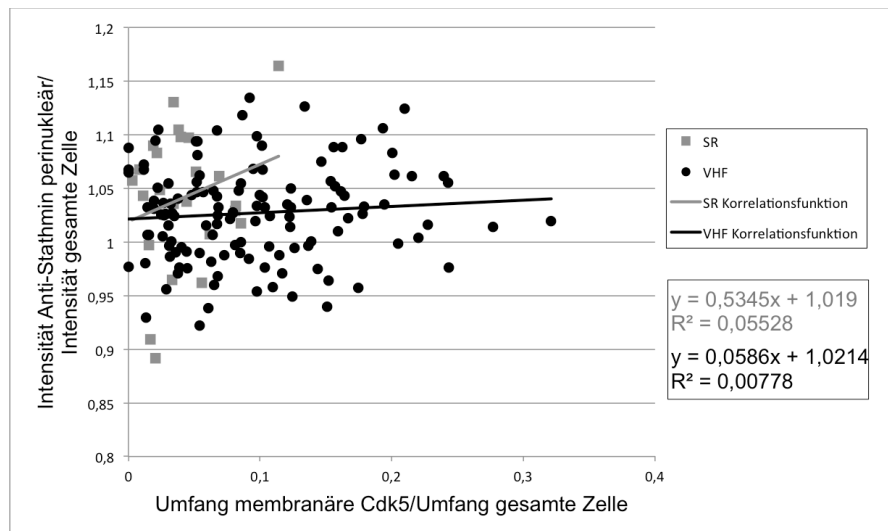


Anlage A 4 lineare Korrelationen zwischen der der Anzahl der Tubulinfilamente und den Parametern Intensität von Anti-Stathmin und Umfang der Cdk 5





Anlage A 5 lineare Korrelationen zwischen der Intensität von Anti-Stathmin und dem Umfang der Cdk 5



13 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

15 Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. med. F. W. Mohr für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation am Herzzentrum in Leipzig und für die Bereitstellung der Labore, Materialien und Geräte.

Des Weiteren danke ich recht herzlich meinem betreuenden Professor Dr. med. S. Dhein für die Vergabe des Themas sowie für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Promotion. Die vielen Anregungen und konstruktiven Gespräche sowie Hinweise waren mir stets eine große Hilfe.

Ich möchte mich weiterhin bei Frau PD Dr. Heike Franke vom Rudolph-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig bedanken. Sie stellte mir das LSM Mikroskop für die Durchführung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen zur Verfügung und stand mir stets mit Rat und Tat zu Seite.

Außerdem gilt mein besonderer Dank allen Mitarbeitern und Doktoranden der Forschungslabore des Herzzentrums Leipzig für die Einarbeitung in die Methoden sowie für die hilfreichen Diskussionen, Ideen, Vorschläge und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich konnte mich immer mit allen Anliegen und Fragen vertrauensvoll an sie wenden.

Letztendlich möchte ich noch meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden von ganzem Herzen danken, die mich in allen Lagen und Zeiten unterstützt und motiviert haben. Ohne Ihre Förderung und Geduld wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nur schwer umzusetzen gewesen.